

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Implicación de los Receptores Fc y el
Factor Nuclear- κ B en la Aterosclerosis
Experimental: Mecanismos Moleculares y
Aplicaciones Terapéuticas.**

TESIS DOCTORAL

BEÑAT MALLAVIA ONAINDIA

Madrid, 2012

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Implicación de los Receptores Fc y el
Factor Nuclear- κ B en la Aterosclerosis
Experimental: Mecanismos Moleculares y
Aplicaciones Terapéuticas.**

TESIS DOCTORAL

**BEÑAT MALLAVIA ONAINDIA
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**DIRECTORES: CARMEN GÓMEZ GUERRERO
Y JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS**

**LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL
Y PATOLOGÍA VASCULAR. IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Doña Carmen Gómez Guerrero, Doctora en Ciencias Químicas, y Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que Don Beñat Mallavia Onaindia, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Implicación de los Receptores Fc y el Factor Nuclear- κ B en la Aterosclerosis Experimental: Mecanismos Moleculares y Aplicaciones Terapéuticas.” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 22 de Mayo de 2012

Los directores de tesis,

Vº Bº El tutor,

Dra. Carmen Gómez Guerrero Dr. Jesús Egido de los Ríos Dr. Juan José Aragón Reyes

“La única verdad es la realidad”

Aristoteles

“This is there is” Es lo que hay (más o menos)

Segundo

A mis padres

A mi tío

A Cristina.

AGRADECIMIENTOS

Bueno, pues ya hemos llegado a este momento tan esperado. No se si seré capaz de expresar en palabras lo que han sido estos 6 años en “la funda” con todos mis compañeros y amigos y me temo que es posible que me olvide de alguien en este apartado, así que de antemano pido disculpas si es así y allá van.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Egido la oportunidad de trabajar en su laboratorio sin cuya aportación esto no existiría.

Quiero agradecer especialmente a Carmen “la jefa” de todos, por la oportunidad que me dio. Al final todos los jefes tienen becarios y todos los becarios tienen jefes, pero lo que está claro que jefas como tú no hay muchas. Me gustaría agradecerte la confianza, el esfuerzo y la paciencia que inviertes cada día en cada uno de nosotros y ese trato de amistad que me temo no voy a encontrar en muchos sitios. De verdad, muchas gracias.

Por supuesto mis otros dos jefes, Lupe y Oscar, vais juntos porque creo que hacéis buen equipo. Vuestro trabajo, vuestra forma de enseñar y vuestra amistad es algo que no olvidaré nunca. No es fácil coger un becario que no conoces de nada, te lo encasquetan y además de enseñarle tienes que llevarte bien con él. Aun así sois mis amigos, ambos dos me habéis ayudado a llegar a “mayor” y os lo agradezco de verdad. A ver si en un futuro no muy lejano nuestros caminos vuelven a cruzarse, sería un placer. Un abrazo para Lutxo y para alguna otra que no conozco.

Mi otra compi Vir, muchas gracias por tu ayuda siempre disponible y por enseñarme que aunque no todo el mundo es igual, hay muchas cosas que valen mucho la pena en casi todos nosotros y sobre todo, por ser mi amiga además de compañera.

A las nuevas generaciones del grupo, a mis niñas, Ainhoa y Carlota, no se si habré sabido enseñaros a trabajar bien, pero lo que vosotras me habéis enseñado a mí es que la alegría y el buen rollo es una de las mejores herramientas en el trabajo y fuera de él. No cambiéis nunca! Y espero que os vayan muy bien las cosas a partir de ahora. A Iolanda mi casi jefa, muchas gracias por tu entrega en un nuevo proyecto como es este grupo y por enseñarnos a todos que ser una persona organizada y responsable no está reñido con ser maja y una amiga más. Gracias a las tres.

A mis coleguitas, Juan y Julito, que os voy a contar a vosotros, me he sentido como en casa con vosotros, para un Basko que deja una cuadrilla de 40 en su pueblo y está tan lejos de casa, ser colega vuestro ha sido y es como llevarme una parte de mi entorno a Madrid. Nos lo

hemos pasado muy bien y espero que no tardemos mucho tiempo en volver a juntarnos en algún labo. Gracias cabr....es y un besazo a Ana y Andrésín.

A los otros amigos del labo. Luisete y Jose Luis, con vosotros me ha quedado claro que ser un brillante científico no está para nada reñido con ser personas majas, gente normal y colegas de fiesta, un placer trabajar junto a vosotros. Anita, nunca una madre tuvo tanta caña como tú, todo un ejemplo, un beso para Nelo y Claudia. Susana mi compi de mesa, eres un ejemplo de aún siendo la más joven, hacer las cosas como se deben hacer. No cambies y enhorabuena por el anillo, espero que seáis muy felices. Elena, la última incorporación, en este breve tiempo has transmitido más cercanía y buen rollo que muchos durante años, gracias maja. Tarín, el pequeño gran hombre, sobre todo grande (sin coñas) me alegro que hayas venido, eres un txabal muy majo y espero que tengas mucha suerte en adelante. Por supuesto a las que no están, Roxi, cuantas tardes compartidas, cuantas cervezas disfrutadas y cuantas risas no hemos echado, espero que te vaya muy bien allá donde estés y me encantaría volver a trabajar contigo, gracias txabala! Bego, la ahora mamá y antes la fiestera, el primer día que me gritaste a la oreja en un garito me acojoné un poco, pero al final se te coge cariño, me lo he pasado muy bien contigo en el labo y espero que en Alemania o en Madrid te vaya muy bien “alcorconqueen”, y un beso para Gerhard y Ania. Lola, carácter, contigo he aprendido que las cosas a la cara son mejores, espero que te vaya muy bien fuera o aquí de vuelta. Cristinita, no tengo palabras, cuando llegaste pensé que estabas un poco loca, ahora sé que lo estás, pero nadie transmite más alegría, inocencia y ganas de hacer las cosas mejor que tú, eres auténtica y sé que no hace falta decirte esto, pero no cambies nunca! Valva, me ha encantado conocerte, una tía majísima y espero que te vaya muy bien en el labo y en esas aventuras africanas que tanta envidia me dan. A los Albertos y los Alvaros, txabales muchas gracias por ser gente tan maja, he aprendido mucho con vosotros, sobre todo a tratar bien y a ayudar a todos siempre. Jon, el otro basko, me pareciste un currante de verdad y además una persona a la que todos acudían para pedir consejo, espero que de jefe sigas siendo tan buen txabal y que te vaya todo muy bien y enhorabuena por la niña. Concepción, Conchi para los amigos, anda que no hemos compartido horas y horas eh! Bueno ánimo que ya no te falta casi nada para que estés escribiendo estas líneas y estoy seguro que lo vas a hacer muy bien. Muchos ánimos!!! Sarita, una persona diferente, capaz de hacer sentir a gusto a los que están a tu alrededor, la alegría y buen humor que desprendes son la hostia! Ánimo que a ti tampoco te falta nada! Belén e Irene, me lo he pasado muy bien con vosotras y espero que os vaya muy bien en el futuro y sigáis siendo tan alegres como ahora. Ernesto, Cristian y al chico exquisito, Alfonsín, vuestra llegada ha traído sangre fresca y buena al labo, ha sido un placer conocerlos y espero que sigáis poniendo musicota de la buena (Give me poison NO). Charli y Beita, vaya pareja de dos, he aprendido mucho con vosotros y he disfrutado mucho con vuestra compañía, ojalá os vaya todo muy bien,

no le levantes demasiado el labio a Carlos y no pegues muchas collejas amistosas a la gente, aunque los demás nos echemos unas risas, un beso muy gordo.

Al resto de la familia del labo. Raul, el Maldini del labo, gracias por los partidos y por tu ayuda siempre que lo he necesitado. Raquel, todo llega y ya es nuestra hora, ánimo con la defensa y suerte en adelante. Mati, poca gente hay más maja que tú, gracias por venir y espero que te vaya muy bien en adelante. Jose, compañero de labo y de games, espero que tengas mucha suerte con tu curro. Sandra, ya no queda mucho, ánimo. Marian, a pesar de no coincidir en algunas cosas creo que eres una gran persona y parte de esta tesis también es tuya. Jonay, un txabal tranquilo donde los haya, espero que tengas mucha suerte y termines todo bien. Pris, Carolina, Macarena, Ana G y Olga, un placer conoceros y trabajar con vosotras. A los senior del labo, Rosario, Adrian, Oscar, Esther y Marta, suerte con lo vuestro. A los de enfrente, Elisa, muchos ánimos txabala que con la fuerza de voluntad que demuestras cada día conseguirás la tesis y mucho más. Sergio, ánimo txabal ya no queda nada. Kike, que tengas mucha suerte, Carlos, que te vaya muy bien. A los que ya no están, Ruth, Olaya, Juanjo, Nando y Lorena, espero volver a coincidir con vosotros en algún centro en el futuro.

A las chicas de Inmuno. Bea, me pareces una curranta de las que no quedan, que tengas mucha suerte allá donde estés y un abrazo para Luis. Cristina la andaluza, menuda alegría andante, me ha encantado conocerte, que termines muy bien lo que te queda, un beso. Mari Paz, compañera de bolazos, fiestas y bicicletas, me lo he pasado muy bien contigo, a ver si terminas pronto y te vienes con nosotros allende los mares, suerte txabala!. A Vero, algún día iremos al karaoke. A la familia de Esbrit, Marta, Sergio, Juanan, Dani y Ana, ha sido muy bonito la solidaridad entre becarios más que entre jefes, vamos a seguir siendo todos compañeros que nos seguirá yendo a todos mucho mejor, gracias por vuestra ayuda en todo. A los de Reuma, gracias por vuestra ayuda cada vez que lo he necesitado.

A los del animalario.; Carlos, ánimo txabalote que te quejas, pero en realidad vives y te lo pasas muy bien, paciencia con las chicas de oro que no te queda otra. Pilar, Juani y Maria Luisa, me lo he pasado muy bien con vosotras ahí arriba, seguid haciendo el milagro de los peces y los panes con los ratones, que luego ya los repartiremos nosotros, gracias a los cuatro por vuestro trabajo.

A Carmen, menudo torbellino de persona, aunque a veces se te pira un poco, contigo he aprendido que en la vida, todos tenemos nuestro sitio y lo importante es intentar ser felices centrándonos en lo que nos conviene y no amargarnos con las cosas feas de la vida. Espero que sigas muchos años dando coba a las nuevas generaciones, te apreciamos de verdad. A Isabel, Pilar y Flor, muchas gracias por vuestra ayuda.

A los alemanes os lo agradezco en inglés que mi alemán no llega a tanto; Thank you very much to my Deutsche friends, Reinhard, Biene, Sussan, Susanne, Mareike and Sylvia, it was a real pleasure to share those months with you. Despite of the fresh weather, I felt like at home in your lab and I really enjoyed going out and learning Deutsche traditions like the Glühwein in one of the most wonderful places I have ever been, Lübeck. Thank you very much for your help otherwise this book wouldn't be possible.

A mi cuadrilla de Madrid. Carliños, compañero, ha sido muy divertido compartir casa contigo. A pesar de ser mi polo opuesto en muchas ideas, hemos convivido como buenos hermanos y se que me llevo un amigo para siempre. Gracias por todo. María, la Mery, una pedazo de tía, creo que eres una de las mejores personas que he conocido, siempre dispuesta a ayudar en todo y siempre dispuesta a divertirse con los amigos, no cambies nunca y sé que siempre estarás ahí cuando te necesitemos, muchas gracias. Carmela, la alegría cantábrica! Eres una persona que me quedo para toda la vida, espero que terminemos muy cerca unos de otros ya sea fuera o cuando regresemos. Disfruta de la vida que así aprendemos el resto a disfrutarla. Sarita, mi andaluza, eres la alegría de la huerta y sé que lo seguirás siendo, espero que estés muy bien en Madrid o donde terminemos y siempre seguiremos siendo amigos. Cristinita, la en... has sido lo más parecido a una hermana que he tenido en mi vida, a pesar de lo que me quejo se que siempre estás ahí y Jorge ha triunfado que ni se lo cree. Un abrazo txabalote. Esti, una tía con tanto carácter que al principio asustas, pero una persona de las que de verdad merecen la pena. Creo que ganaste mucho con tu cambio a los estates, y espero que no muy tarde volvamos a vivir cerca para poder disfrutar de tu amistad. Espero que seas muy feliz con Martin, ya iré a veros en breve. Ianire y el Toledano, me encanta estar con vosotros sois una gran pareja y os doy las gracias por ser mis amigos y compartir tantos buenos momentos como los que hemos vivido. Que os vaya muy bien. Jesusillo, eres parte de la cuadrilla de Madrid, mi colega de deportes varios y un amigo de verdad. Conozco pocas personas más humildes que tú, eres un tío de la hostia, sigue así. Rosa, aunque no hables mucho, eres una chica muy maja, espero que te vaya todo muy bien. Luisillo, mi primer compañero y hermano, no es fácil siendo hijos únicos ponernos a compartir habitación y llevarnos tan bien como lo hicimos. Eres un tío de p. madre, contigo aprendí que lo importante de las personas está en el interior, aunque por fuera te persiga la segurata del super y tú eres un txabal que mereces mucho la pena, un abrazo muy gordo. David, te incluyo aquí porque eres de mi cuadrilla de Madrid, desde pequeño he pensado que tus ganas de aprender sobre ciencia eran incomparables, pero ahora veo que tus ganas de aprender sobre todo con tanto entusiasmo como demuestras no las tiene nadie. Siempre has sido mi amigo y aunque no nos vemos todo lo a menudo que nos gustaría, se que siempre estarás ahí cuando te llame, gracias amigo.

A mi cuadrilla de Ermua. Sois mi tercera familia, no puedo poner todos los nombres porque necesitaría otra tesis, pero todos sabemos que lo que tenemos no se paga con dinero. Sé que siempre esté donde esté, podré contar con vosotros para cualquier cosa y aunque nos falta un poco de ganora, ser amigo vuestro es de lo mejor que me ha pasado en la vida. Eskerrik asko danori.

A mi segunda familia. Suegros, cuñado y concuñado, tíos, abuelos, enanos... a todos os agradezco de todo corazón que me hayáis dado la oportunidad de formar parte de esta maravillosa familia. Estar en Caleruega es estar en el pueblo que nunca he tenido, con una familia diferente a la mía pero donde me habéis acogido como uno más desde el primer día. Os quiero a todos. También quiero agradecer a la cuadrilla de Aranda, chicas hacéis un grupo muy bonito, ya tendré tiempo de disfrutar más cosas con vosotras. Un beso.

A los de casa, esto va en Euskera como debe ser. Ama eta Aita, ez daki tzelan eskertu leiken nigaitxik urte guzti hauetan ein dozuena. Txikitxen pistinara jutera derrigortzetik, nauzitxen Cristinan eta bixon erabakixek eskuek zabalik onartzera. Badakit urriñara goiazela eta dempora baten ez zaitxuetela ikusiko, baina beti egon zarie nigaz eta badakit beti egongo zariela gero be. Eskerrik asko emon doztazuen danagaitxik. Tio Joseri, nire bigarren aitari, zauezan lekuen zauezela eskerrak emoten dotzudaz beti hainbeste maitatziagatik. Beti egon za nigaz eta beti egongo za. Amamari eta aitxixari, zuengandik jaso doten maitasune eta denporie ezin leike berbatan kontau, beti izango zarie nire amama eta aitxitxe, munduko personarik onenak. Tio Juani, momento txar honetan erakusten dozun indarra beti barruen euki dozun persona honan espillue da, animo ta ikusikozu zelan dana ondo urtetan dan, zuk betieutsi gogor. Iñakiri, nire lehengusuai, espero dot gauzak oso ondo juatie Elgoibar alde hortan, beti izengo za nire lehengusu “txikixe”. Arantxari, Juanmariri, Tiari eta Tio Jabierreri, zuek nire beste familia zarie, beti egon naz zuekin etxien moduen, eskerrik asko. Nire hiru umieri, zuek zarie familia on honen fruitue, asko, beneten asko sentitzen dot lanagaitxik zuekin egoteko hainbeste dempora galtzie baina bueltauko gara egunen baten eta beti izengo naz zuen lagune. Askok maite zaitxuet. danok.

Y ya sólo me quedas tú, mi vida. No puedo agradecerte en palabras lo que te debo, así que no lo voy a hacer. Sólo me queda terminar pronto y volar para disfrutar mi vida con la mejor persona que conozco. Eres mi otra mitad sin la que no puedo vivir, y por suerte se que no tendré que hacerlo. Sin tí este libro ni esta vida tendrían ningún sentido así que no te agradezco esta tesis, te agradezco el resto de nuestra vida juntos. Te quiero.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- **Mallavia B**, Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O , Oguiza A, Recio C, Lazaro I, Schindler S, Depping R, Egido J, Gomez-Guerrero C. Inhibition of nuclear factor- κ B translocation with synthetic peptides reduces atherosclerotic lesions in mice. *FASEB J* (en revisión).
- **Mallavia B**, Lopez-Franco O, Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Recio C, Oguiza A, Hernandez-Vargas P, Suzuki Y, Egido J, Gomez-Guerrero C. Differential macrophage activation underlies the atheroprotective effect of Fc γ receptor deficiency in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (en revisión).

Trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:

- Fernández-Vizarra P, López-Franco O, Higuera-Matas A, **Mallavia B**, López-Parra V, Ortiz-Muñoz G, Ambrosio E, Egido J, Almeida OFX, Gómez-Guerrero C. Immunoglobulin G Fc γ receptor deficiency protects mice against Alzheimer-like pathology and cognitive impairment. *Brain* 2012 (en prensa).
- Lopez-Parra V, **Mallavia B**, Lopez-Franco O, Ortiz-Muñoz G, Oguiza A, Recio C, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gomez-Guerrero C. Functional deficiency in activating Fc γ receptors attenuates diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice. *J Am Soc Nephrol* 2012 (en prensa).
- Ortiz-Muñoz G, **Mallavia B**, Egido J and Gómez-Guerrero C. Renal delivery of adenovirus and antisense oligonucleotides in rats by retrograde renal vein injection. *Methods Mol Biol* 2012;886:321-9.
- Lopez-Parra V, **Mallavia B**, Egido J, Gomez-Guerrero C. Immunoinflammation in diabetic nephropathy: molecular mechanisms and therapeutic options. *Diabetic Nephropathy* (Intech Ed: JSD Chan), 2012. ISBN978-953-308-11-6
- Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, **Mallavia B**, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J Biomed Biotech* 2011; 2011:497841.

- Gómez-Guerrero C, **Mallavia B**, Egido J. Targeting Inflammation in Cardiovascular Diseases. Still a Neglected field? *Cardiovasc Ther* 2011 Apr 1. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00274.x
- Egido J, Ruiz-Ortega M, Gonzalez-Parra E, Rico-Zalba L, Fernandez-Fernandez B, **Mallavia B**, Ortiz A, Gomez-Guerrero C. Tratamiento de la nefropatía diabética: más allá del bloqueo del sistema renina-angiotensina. *Nefrologia* Suplemento Extraordinario 2011;2(5):77-84.
- Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, **Mallavia B**, Flores C, Sanz A, Blanco J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, and Gomez-Guerrero C. Suppressors of Cytokine Signaling Abrogate Diabetic Nephropathy *J Am Soc Nephrol* 2010;21:763–772. *Comentario editorial* por: FC Brosius, and A Banes-Berceli. *J Am Soc Nephrol* 2010;21: 723–724.
- Ortiz-Muñoz G, Martin-Ventura JL, Hernandez-Vargas P, **Mallavia B**, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Muñoz-Garcia B, Fernandez-Vizarra P, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Supressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Apr;29(4):525-31.

La aterosclerosis es una enfermedad compleja caracterizada por la acumulación progresiva de lípidos, células y matriz extracelular. Hoy en día es considerada una enfermedad inflamatoria, ya que la activación de mecanismos inmunes e inflamatorios juega un papel central en el inicio, progresión y desestabilización de las placas. Este trabajo aborda dos aspectos del proceso aterogénico: la respuesta inmune asociada a los receptores de Inmunoglobulinas G (FcγR) y la actividad inflamatoria del factor nuclear-κB (NF-κB).

En la primera parte analizamos la contribución específica de los FcγR de los macrófagos infiltrantes en el desarrollo de las lesiones del modelo experimental de aterosclerosis (ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}) alimentados con dieta hiperlipídica). Para ello, generamos ratones quimera mediante trasplante de médula ósea de ratones deficientes en la cadena-γ, la subunidad necesaria para la funcionalidad de los FcγR activadores. En los ratones con deficiencia funcional en los FcγR de sus células de origen hematopoyético (principalmente macrófagos), encontramos una reducción del tamaño de las lesiones ateroscleróticas y un menor contenido de células infiltrantes (macrófagos y linfocitos T) y mediadores inflamatorios (NF-κB, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión), sin cambios en los niveles séricos de lípidos ni en el patrón de inmunoglobulinas totales y específicas de lipoproteínas de baja densidad oxidadas. La ausencia de FcγR redujo la población de macrófagos pro-inflamatorios M1 y de células espumosas y aumentó los macrófagos con fenotipo reparador M2, tanto en las lesiones como en células peritoneales. In vitro, los macrófagos derivados de médula ósea de ratones deficientes en FcγR mostraron una respuesta atenuada a la estimulación con inmunocomplejos, con menor expresión de genes inflamatorios y estrés oxidativo.

En la segunda parte estudiamos los efectos anti-inflamatorios del péptido permeable SLN que contiene la secuencia de localización nuclear de la subunidad p50 del NF-κB. En células vasculares y macrófagos estimulados con lipopolisacárido, el tratamiento con el péptido inhibidor SLN, pero no su control estructural mutado, previno de forma dosis-dependiente la translocación de NF-κB al núcleo y su posterior actividad transcripcional. El péptido SLN también bloqueó la interacción del NF-κB activado con las importinas (α3, α4 y α5) y redujo la expresión de genes dependientes de NF-κB y la migración en ambos tipos celulares, sin afectar su viabilidad o capacidad proliferativa. En estudios in vivo, el tratamiento con el péptido inhibidor redujo significativamente el tamaño de las lesiones aórticas de ratones ateroscleróticos, así como el contenido de macrófagos infiltrantes, la actividad de NF-κB y la expresión de genes inflamatorios modulados por este factor.

Estos estudios proporcionan las bases para el desarrollo racional de nuevas terapias, como la inmunomodulación basada en el bloqueo de los FcγR o el tratamiento anti-inflamatorio con inhibidores de la translocación nuclear de NF-κB, que podrían aplicarse a la aterosclerosis, una patología con elevado impacto clínico.

Atherosclerosis is a complex disease characterized by progressive accumulation of lipids, cells and extracellular matrix. Nowadays it is considered an inflammatory disease, due to the central role of the activation of immune and inflammatory mechanisms in the initiation, progression and plaque instability. Two aspects of the atherogenic process are approached in this work: the immune response mediated by immunoglobulin G receptors (Fc γ R) and the inflammatory activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B).

Firstly, we analyzed the specific contribution of macrophage Fc γ R to atherosclerotic lesion development in an experimental mouse model, the high-fat diet fed apolipoprotein E deficient mouse. We therefore generated chimera mice by bone marrow transplantation from mice deficient in γ -chain, the common signaling subunit of activating Fc γ R. Mice with functional deficiency in Fc γ R receptor within hematopoietic cells (mostly macrophages), developed significantly less atherosclerotic lesions than controls, with a reduction in leukocyte content (macrophages and T lymphocytes) and inflammatory mediators (NF- κ B, cytokines, chemokines and cell-adhesion molecules). These effects were independent of changes in serum lipids and antibodies against oxidized low density lipoproteins. Activating Fc γ R deficiency also reduced pro-inflammatory M1 macrophages and foam cell population, and increased the anti-inflammatory M2 phenotype, both in lesional and peritoneal cells. In vitro, lack of activating Fc γ Rs reduced the M1/M2 ratio and attenuated oxidative stress and inflammatory gene expression in immune complex-stimulated macrophages.

Secondly, we studied the anti-inflammatory effects of SLN, a cell-permeable peptide containing the nuclear localization sequence of p50 NF- κ B. In cultured vascular smooth muscle cells and macrophages, pretreatment with SLN peptide, but not the mutant control peptide, dose-dependently inhibited the nuclear translocation and subsequent transcriptional activity of NF- κ B induced by lipopolysaccharide stimulation. SLN peptide also blocked the interaction between activated NF- κ B and importins (α 3, α 4 and α 5) and reduced the expression of NF- κ B-dependent genes as well as cell migration, without effects on cell viability. In vivo, SLN peptide treatment in atherosclerotic mice significantly reduced aortic lesion size and attenuated NF- κ B activity and expression of target genes in the plaques.

These studies provide the basis for the rational development of new therapies, such as immunomodulation based on Fc γ R blockade and anti-inflammatory treatment with inhibitors of NF- κ B nuclear translocation that could be applied in atherosclerosis, a disease with great clinical impact.

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Aterosclerosis: Una enfermedad inmunoinflamatoria	1
2. El papel del sistema inmune en la aterosclerosis	3
2.1. Células del sistema inmune	3
2.1.1 Monocitos y macrófagos	4
2.1.2. Células Espumosas	6
2.1.3. Células Dendríticas	6
2.1.4. Linfocitos	7
2.2. Respuesta inmune humoral	7
2.2.1. Inmunoglobulinas e inmunocomplejos	7
2.2.2. Receptores Fc de inmunoglobulinas	9
2.2.3. Papel <i>in vivo</i> de los FcγR en la inflamación	10
3. Mediadores inflamatorios en aterosclerosis	11
3.1. Citoquinas quimioquinas y moléculas de adhesión	11
3.2 El factor de transcripción NF-κB en la aterosclerosis	13
3.2.1 La vía NF-κB	13
3.2.2 Mecanismo de translocación nuclear de NF-κB	15
3.2.3 Modulación de la activación de NF-κB en la aterosclerosis	17
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAL Y MÉTODOS	21
1. Estímulos e inhibidores	19
1.1. Estímulos	19

1.2. Diseño del péptido permeable inhibidor de la translocación nuclear de NF- κ B	19
2. Cultivos celulares.....	20
2.1. Cultivo de células de músculo liso vascular de ratón.....	20
2.2. Cultivo de macrófagos de ratón.	20
2.2.1 Extracción de macrófagos peritoneales.	20
2.2.2. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea.	20
2.2.3. Línea de macrófagos murinos RAW 264.7.	21
2.3. Cuantificación de células espumosas	21
2.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.	21
2.5. Ensayos de migración.	21
3. Modelos animales de aterosclerosis.	22
3.1. Animales empleados.	22
3.2. Transplante de médula ósea.	22
3.3. Modelo de tratamiento de la aterosclerosis experimental mediante un péptido permeable.....	24
4. Análisis histológico.	24
4.1. Procesamiento de tejidos.....	24
4.2. Histología e inmunohistoquímica.....	25
4.3. Southwestern <i>in situ</i>	26
4.4. Cuantificación de tinciones.	27
5. Análisis de proteínas.	27
5.1. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	27
5.1.1. Extracción de proteínas nucleares.	27

5.1.2. Ensayo de unión al DNA.	27
5.2 Western blot.....	28
5.3. Ensayo de unión proteína-proteína (<i>pull-down</i>).	28
5.4. Inmunofluorescencia en células.....	29
5.5. ELISA.	29
6. Análisis de RNA.....	30
6.1. Extracción RNA.	30
6.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....	30
7. Medida de estrés oxidativo.....	31
8. Análisis estadístico	31
IV. RESULTADOS	35
PARTE I: PAPEL DE LOS FcγR DE LEUCOCITOS EN LA ATHEROSCLEROSIS	
EXPERIMENTAL.....	33
1. Estudios <i>in vivo</i> : Trasplante de médula ósea en ratones.	33
1.1 El trasplante de células de médula ósea de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ trasplantados a ratones apoE $^{-/-}$ reduce la formación de lesiones ateroscleróticas.	34
1.2. La deficiencia de la cadena-γ en leucocitos disminuye su acumulación en la lesión aterosclerótica.	35
1.3. El trasplante de médula de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ reduce la inflamación en el arco de los ratones apoE $^{-/-}$	37
1.4 Distribución de inmunoglobulinas en el suero de los ratones ateroscleróticos.....	40
1.5. El trasplante de médula ósea de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ promueve el fenotipo M2 en los macrófagos de la lesión y sistémicos.....	41
2. Estudios <i>in vitro</i> : macrófagos derivados de médula ósea.	43

PARTE II: MODULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL.....	46
1. Acciones <i>in vitro</i> del péptido inhibidor SLN.	46
1.1. Efecto del péptido SLN sobre la viabilidad y la proliferación celular.	48
1.2. Modulación de la expresión de genes dependientes de NF- κ B por el péptido SLN.	49
1.3. El péptido SLN bloquea el transporte nuclear del NF- κ B activado.	50
1.4. Los péptidos SLN inhiben la capacidad migratoria de células vasculares y macrófagos.	51
2. Estudios <i>in vivo</i> : Tratamiento con el péptido SLN en la aterosclerosis experimental.	53
2.1. El tratamiento con el péptido SLN reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica y su contenido inflamatorio.....	53
2.2. El péptido SLN inhibe la actividad NF- κ B y la expresión de genes pro-inflamatorios en aortas de ratones ateroscleróticos.	55
V. DISCUSIÓN	58
PARTE I. ENFOQUE INMUNOLÓGICO: El papel de los Fc γ Rs de leucocitos en el desarrollo de la aterosclerosis experimental.	59
PARTE II. ENFOQUE INFLAMATORIO: El tratamiento con péptidos sintéticos i nhibidores de la translocación nuclear de NF- κ B reduce la aterosclerosis experimental inhibiendo los procesos inflamatorios en las lesiones.	66
VI. CONCLUSIONES	73
VII. REFERENCIAS	75

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el jenguaje científico.

Ac:	anticuerpo
Ag:	antígeno
AP-1:	proteína activadora-1
ApoE:	apolipoproteína E
Arg:	arginasa
BSA:	albúmina bovina
CCL2:	ligando de quimioquina 2 (con motivo C-C)
CCL5:	ligando de quimioquina 5 (con motivo C-C)
CMLV:	célula de músculo liso vascular
CPN:	complejo de poro nuclear
CRP:	proteína C reactiva
CSF:	factor estimulador de colonias
DHR:	dominio ge homología Rel
DAB:	3, 3-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina
DAT:	dominio de activación transcripcional
DTT:	ditiotreitol
EDTA:	ácido etilendiamino tetraacético
EGTA:	ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
EMSA:	ensayo de retardo de movilidad electroforética
Fab:	región variable de inmunoglobulina
Fc:	región constante de inmunoglobulina
Fc γ R:	receptor Fc de inmunoglobulinas G

FITC:	isotiocianato de fluorescencia
GST:	glutation-S-transferasa
GAPDH:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HEPES	ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
IC:	inmunocomplejo
ICAM:	molécula de adhesión intracelular
INF- γ :	interferón - γ
Ig:	inmunoglobulina
I κ B:	subunidad inhibitoria κ B
IKK:	quinasa de I κ B
IL:	interleuquina
ITAM:	motivo de activación de inmunoreceptores basado en tirosina
ITIM:	motivo de inhibición de inmunoreceptores basado en tirosina
LDL:	lipoproteína de baja densidad
LPS:	lipopolisacárido
MAPK:	proteína quinasa activada por mitógeno
MIF:	factor inhibidor de migración de macrófagos
MTT:	1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
NFAT:	factor activador de células T
NF- κ B:	factor nuclear- κ B
NO:	óxido nítrico
PBS:	tampón fosfato salino
PMSF:	fenilmetilsulfonil fluoruro
PVDF:	difluoruro de polivinilideno

PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
SDS:	dodecil sulfato sódico
SFB:	suero fetal bovino
SLN:	secuencia de localización nuclear
TGF β :	factor de crecimiento transformante β
TNF- α :	factor de necrosis tumoral- α
VCAM:	molécula de adhesión celular vascular
WT:	fenotipo salvaje



I. Introducción

1. Aterosclerosis: Una enfermedad inmunoinflamatoria.

La “aterosclerosis” es el tipo más común de “arterioesclerosis” o endurecimiento de las arterias, que es causado por el desarrollo de placas ateromatosas en la pared de los vasos. En la Europa del siglo XIX, pocas décadas después de que Jean Lobstein acuñara el término de arterioesclerosis, existían ya dos ideologías distintas y enfrentadas acerca de los factores inductores de esta enfermedad. Por un lado, la escuela Viena de Rokitansky promulgaba la teoría humoral (un componente de la sangre, la fibrina, depositada en la pared vascular era el origen de los ateromas) y por otro lado, la escuela Alemana encabezada por Rudolf Virchow que defendía la importancia de la inflamación en el comienzo y desarrollo de la aterosclerosis¹⁰⁴. Hoy en día se define la aterosclerosis como un desorden crónico y de lenta progresión que afecta a las arterias medianas y grandes en el que se produce gran acumulación de lípidos junto con la infiltración de leucocitos como macrófagos y linfocitos, seguido de la formación de una capa fibrosa compuesta mayoritariamente por el colágeno producido por células de músculo liso vascular (CMLV)⁵⁴. Esta enfermedad es la primera causa de muerte en los países industrializados.

Las arterias están formadas por tres capas concéntricas:

-*Túnica interna o íntima*: Compuesta por una capa de células endoteliales, una lámina basal y tejido conectivo subendotelial laxo. Esta capa es la encargada del contacto con el medio interno, el torrente sanguíneo.

-*Túnica media*: Capa formada por varias capas concéntricas de CMLV metabólicamente muy activas y responsables de la síntesis de la matriz extracelular.

-*Túnica adventicia*: Capa externa compuesta principalmente de colágeno y elastina por la que circulan los vasos sanguíneos propios (*vasa vasorum*) que irrigan a los vasos sanguíneos de gran calibre como la aorta. En esta capa se encuentran también las fibras nerviosas del vaso¹.

El aumento del colesterol en sangre es uno de los principales factores de riesgo en la enfermedad aterosclerótica. El colesterol es transportado en sangre unido a distintas lipoproteínas, entre ellas las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas contienen colesterol esterificado y triglicéridos rodeados por una capa compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteína Apo-B100⁵⁴. Una alta concentración de LDL en sangre, junto con otros factores, como hipertensión, diabetes o estímulos pro-inflamatorios, son capaces de inducir cambios en la barrera endotelial del vaso permitiendo así la entrada y acumulación de LDL en la zona subendotelial⁸⁸. Las lipoproteínas acumuladas en la pared del vaso son modificadas por diferentes enzimas secretadas tanto por células endoteliales como por las CMLV formándose, en el caso de las LDL, las modificadas por oxidación (LDLox), glicosilación o agregación a aldehídos. Las células circundantes (endoteliales, CMLV y leucocitos residentes) son activadas por acción de las LDLox, lo que induce cambios en su patrón de expresión génica. Así, las células endoteliales

expresan en su membrana proteínas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1) y selectinas (P-selectina)⁴⁰ que permiten a los leucocitos circulantes, principalmente monocitos, reducir su velocidad migratoria y unirse firmemente a la superficie endotelial. A continuación, los monocitos se extravasan a la zona subendotelial gracias a otras proteínas de membrana denominadas integrinas. Tanto las células endoteliales como las CMLV activadas por LDLox secretan gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias que favorecen la acumulación de monocitos. Los monocitos extravasados se activan por efecto de las citoquinas de su entorno, maduran a macrófagos y expresan numerosas proteínas de membrana, como receptores *scavenger* (basurero), receptores *toll-like* (TLR), receptores Fc de inmunoglobulinas (FcR) y receptores de citoquinas, entre otros. A través de los receptores *scavenger*, las células monocíticas fagocitan grandes cantidades de LDLox y se convierten en células espumosas con un alto contenido lipídico. Las células espumosas secretan grandes cantidades de mediadores inflamatorios que aceleran el reclutamiento de más leucocitos, produciéndose así un bucle de inflamación en el lugar de la lesión.

Las CMLV son los principales componentes de la capa media de las arterias. Estas células producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular que mantienen la integridad de los vasos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en condiciones inflamatorias, las LDLox y macrófagos acumulados en la capa íntima del vaso inducen la secreción de citoquinas pro-inflamatorias implicadas en la proliferación y migración de las CMLV. De hecho, uno de primeros pasos en la formación de la placa aterosclerótica es el engrosamiento de la capa íntima denominada “neointima”, que se produce por la acumulación de células espumosas y por la migración y proliferación de CMLV en esta zona de la pared arterial. A su vez, las CMLV activadas secretan gran cantidad de citoquinas, lo que favorece el entorno inflamatorio de la lesión ateromatosa.

Podemos diferenciar dos tipos de placas ateroscleróticas en humanos: estables y vulnerables. Generalmente, las placas estables ricas en matriz extracelular y CMLV, suelen ser asintomáticas, mientras que las placas vulnerables son ricas en macrófagos y células espumosas y su capa fibrosa (matriz extracelular compuesta de colágeno y elastina) es más débil y propensa a la rotura⁸⁸. Los efectos más adversos de las placas ateroscleróticas se producen cuando se rompe esta cápsula fibrosa (principalmente en los laterales u “hombros”) y el material trombogénico del núcleo necrótico entra en contacto con las proteínas coagulantes de la sangre, formándose los trombos, compuestos de plaquetas agregadas y unidas a otros componentes séricos. El trombo liberado puede producir diferentes efectos patológicos, como infarto de miocardio, ictus cerebral o tromboembolismo venoso³⁸.

El concepto clásico de la aterosclerosis como patología asociada al depósito de lípidos ha sido reemplazado en los últimos años, pues se considera que la activación del sistema inmune y de respuestas inflamatorias juega un papel vital en el desarrollo de esta enfermedad⁴⁷(Figura 1).

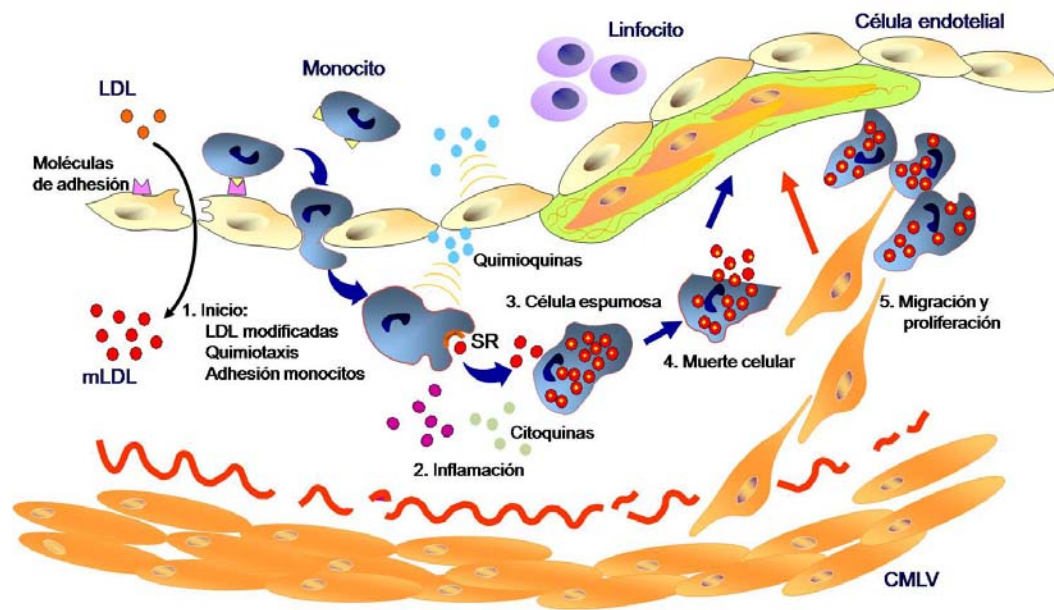


Figura 1: Mecanismos implicados en la formación de la lesión ateroesclerótica. mLDL (lipoproteínas modificadas), SR (receptor *scavenger*).

2. El papel del sistema inmune en la ateroesclerosis.

2.1. Células del sistema inmune.

Aunque la acumulación de LDL sigue siendo uno de los principales factores de riesgo de la ateroesclerosis, los mecanismos inmunológicos implicados en esta enfermedad han atraído un gran interés en los últimos 20 años³⁹. El sistema inmune se puede dividir en dos partes según su función y tiempo de respuesta: la respuesta innata inmediata y la respuesta adaptativa más lenta.

Las células del sistema inmune innato más numerosas que están presentes durante todos los estadios de la ateroesclerosis son los monocitos y las células que derivan de ellos, como los macrófagos/células espumosas y las células dendríticas. Otras células inmunes menos abundantes encontradas en las placas son los neutrófilos (respuesta innata) y los linfocitos T y B (respuesta adaptativa)³⁹ (Figura 2).

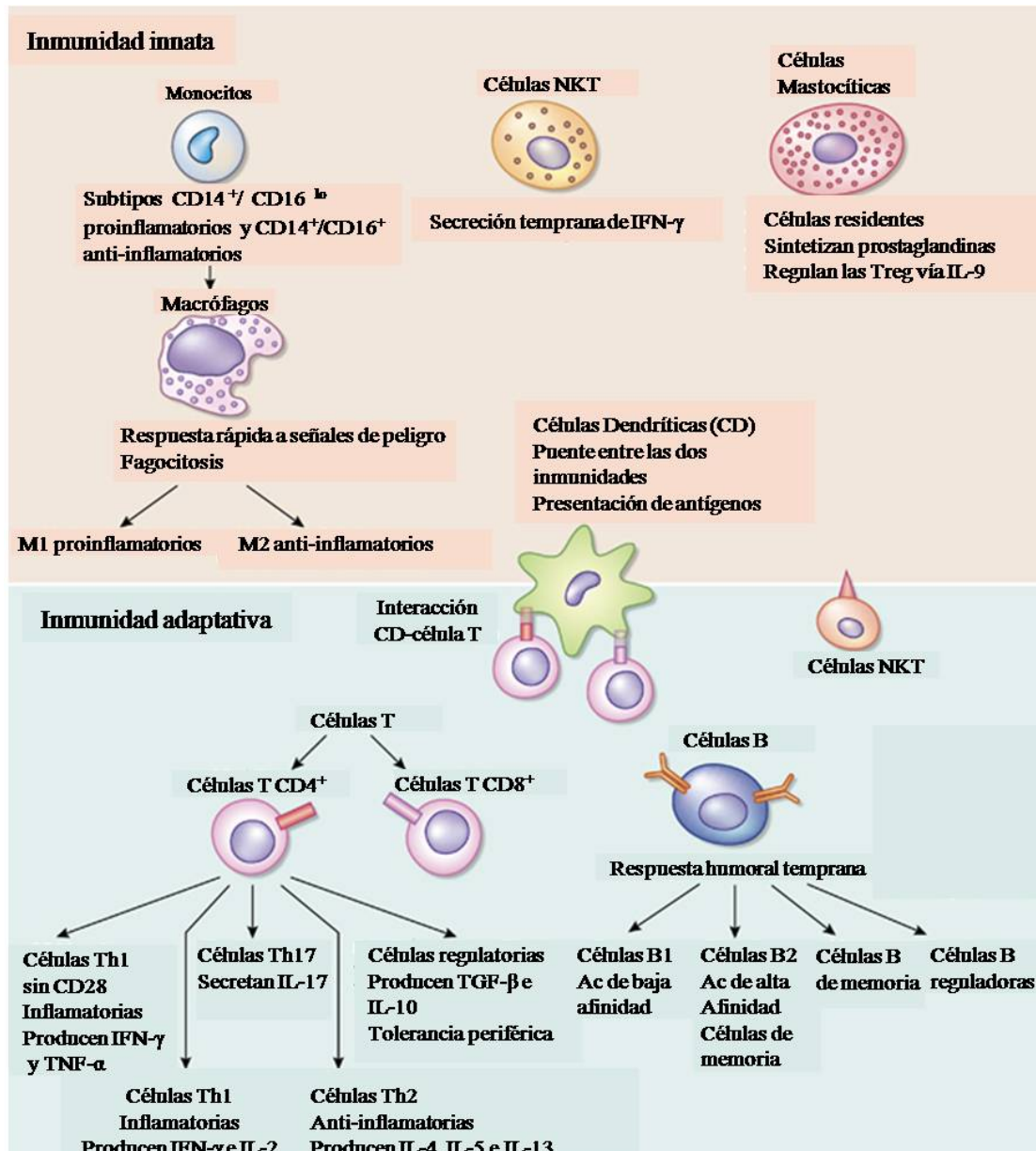


Figura 2: Células del sistema inmune que participan en el proceso de aterogénesis.

2.1.1. Monocitos y macrófagos.

Los monocitos circulantes reducen su velocidad en el torrente sanguíneo mediante la unión a las células endoteliales y, una vez fuertemente adheridas a la pared del vaso, atraviesan la barrera endotelial en un efecto denominado extravasación¹¹⁰. Diversos estímulos inflamatorios aumentan la permeabilidad de la capa de células endoteliales, lo que facilita la extravasación de monocitos. La atracción dirigida de los monocitos hacia la lesión y luego hacia la zona de inflamación subendotelial está mediada por diferentes receptores de quimioquinas presentes en la membrana extracelular de los monocitos y que reconocen a las quimioquinas liberadas por las

células endoteliales y CMLV. Las principales quimioquinas implicadas en este proceso son CX3CL1, CCL2, CCL5 y MIF (factor inhibidor de migración de macrófagos) y sus receptores expresados por los monocitos son CX3CR1, CCR2 y CCR5, entre otros²⁶.

La mayoría de los monocitos atraídos a la zona de la lesión se transforman en macrófagos o en células dendríticas por efecto del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). El papel de estas células fagocíticas en el desarrollo de la aterosclerosis es de vital importancia. En un modelo de ratones deficientes en la apolipoproteína-E (apoE^{-/-}) que desarrollan aterosclerosis de forma espontánea, se ha demostrado que la deficiencia en M-CSF y, por tanto de macrófagos, disminuye el tamaño de la lesión aterosclerótica¹⁴⁷. Los macrófagos presentes en la zona de lesión producen gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias que, por un lado, atraen más leucocitos circulantes y por otro, inducen el remodelado vascular por las CMLV. En lesiones humanas, la cantidad de macrófagos presentes es diferente dependiendo de la zona de la placa, hallándose mayor número de estas células en las zonas de los “hombros” más vulnerables a la rotura.

Es importante resaltar que no todos los macrófagos presentes en la lesión tienen el mismo fenotipo y, por consiguiente, la misma funcionalidad. Los macrófagos derivados de los monocitos se polarizan principalmente a dos tipos celulares: los macrófagos activados clásicamente o M1 (inflamatorios) y los macrófagos activados de forma alternativa o M2 (reparadores)^{76, 100}. Otros tipos de macrófagos se han descrito más recientemente, como Mox (activados por lípidos oxidados), Mres (presentes en la fase de resolución de la inflamación)³ o M4 (inducidos por la citoquina CXCL4)⁴³. En este trabajo nos hemos centrado en los fenotipos M1 y M2, cuyo papel en el desarrollo de la aterosclerosis está mejor establecido. Los macrófagos M1 se pueden polarizar *in vitro* mediante la estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) e interferón- γ (IFN- γ). Este tipo de células se caracterizan por la expresión de CD86, la producción de monóxido de nitrógeno (NO) y citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y las interleuquinas IL-1 e IL-6⁴⁹. Por su parte, los macrófagos M2 se polarizan con citoquinas Th2 como las interleuquinas IL-4 e IL-13 y se caracterizan por la expresión del receptor de manosa¹⁵². Recientemente se ha demostrado que las dos isoformas de la enzima arginasa, la arginasa 1 citoplasmática (Arg1) y la arginasa 2 mitocondrial (Arg2) son también buenos marcadores de macrófagos M2 y M1, respectivamente⁷⁶.

Varios grupos han descrito la presencia de macrófagos M1 y M2 en lesiones ateroscleróticas humanas^{9, 127}. Bouhrel y su grupo mostraron que la distribución de los macrófagos con fenotipo M2 no coincidía con la distribución de las células espumosas, indicando que no todos los macrófagos tienen la misma capacidad fagocítica de LDL modificadas y de diferenciarse a células espumosas⁹. Las funciones de cada tipo de macrófagos son diferentes. Así, los macrófagos pro-inflamatorios M1 secretan citoquinas pro-inflamatorias (IL-7 e IL-8) y moléculas vasoactivas (óxido nítrico y endotelinas), liberan especies reactivas de oxígeno y promueven la proliferación de CMLV. Todos estos efectos conducen a la cronificación de la

inflamación dentro de las placas. En cambio, los macrófagos M2 tienen un papel anti-inflamatorio mediado por diversos factores como TGF- β (inhibe el reclutamiento de células inflamatorias), IL-10 (efecto inmunosupresor de linfocitos T) y además son capaces de eliminar los restos apoptóticos en un proceso denominado eferocitosis. Se ha demostrado en un modelo murino de aterosclerosis, que los macrófagos de lesiones tempranas tienden a ser mayoritariamente de fenotipo M2, mientras que en las lesiones avanzadas predomina el fenotipo inflamatorio M1⁷⁶. Esto indica que podría existir un cambio de fenotipo de los macrófagos en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Por un lado, los M2 podrían ser los encargados de atenuar las respuestas inflamatorias iniciales, pero su efecto podría ser superado por la acumulación de macrófagos M1 pro-inflamatorios.

2.1.2. Células espumosas.

La diferenciación de los macrófagos a células espumosas depende del balance entre captación y liberación de LDL modificadas. La captación se lleva a cabo principalmente mediante los receptores *scavenger* (como SRA y CD36) mientras que en la liberación extracelular de colesterol desde las LDL hacia las partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL), participan los transportadores unidos a ATP A1 (ABCA1) y ATP G1 (ABCG1). Además, se conocen otros mecanismos de captación de LDL, como la fagocitosis de lipoproteínas agregadas y retenidas en la matriz extracelular, la fagocitosis de inmunocomplejos (IC, formados por asociación entre LDLox y anticuerpos anti-LDLox) y la pinocitosis de LDL en estado líquido¹¹⁰. Todo esto conduce a que las células espumosas se conviertan en grandes depósitos de lípidos. Cuando estas células mueren liberan su contenido al espacio intercelular, acumulándose así cristales de colesterol, restos apoptóticos y necróticos y otros factores inflamatorios y procoagulantes. Estas células constituyen el principal componente del núcleo necrótico de las lesiones ateroscleróticas, lo que las relaciona directamente con la vulnerabilidad de las placas¹⁵⁰.

2.1.3. Células dendríticas.

La célula dendrítica es otro tipo de célula fagocítica que puede migrar e infiltrarse diferenciada desde los tejidos linfáticos o puede derivar de los monocitos atraídos a la zona de la lesión. En las placas ateroscleróticas, estas células se encuentran mayoritariamente en la capa íntima de la lesión y son las principales presentadoras de antígenos (Ag) a los linfocitos T no diferenciados o *naive*. Para ello, migran a los ganglios linfáticos secundarios donde presentan a los linfocitos los Ag que han capturado y procesado previamente. La sinapsis inmunológica producida entre las células dendríticas y los linfocitos T es considerada como el comienzo de la respuesta inmune adaptativa llevada a cabo por los diferentes tipos de linfocitos¹⁶²(Figura 2).

2.1.4. Linfocitos.

Los linfocitos son los encargados de producir la respuesta inmune adaptativa que, a diferencia de la respuesta innata llevada a cabo por los macrófagos y otros fagocitos, es capaz de reconocer específicamente millones de Ag y producir una respuesta específica frente a ellos.

Existe cierta controversia respecto al papel del sistema inmune adaptativo en el desarrollo de la aterosclerosis. Algunos autores defienden un papel principalmente pro-aterogénico de los linfocitos. Por ejemplo, en el trabajo de Zhou et al. se muestra un descenso del tamaño de la lesión en ratones sin linfocitos T ni B y un sorprendente aumento en la lesión tras la inyección de linfocitos T en estos ratones¹⁷⁹. En cambio, otros trabajos muestran un papel más protector de los linfocitos. Así ocurre tras la inmunización con Ag específicos, como las LDL modificadas presentes en la aterosclerosis¹²⁵. Incluso un trabajo resta importancia al papel de los linfocitos en la aterosclerosis, mostrando que ratones inmunodeficientes ateroscleróticos alimentados con dieta rica en grasa presentan el mismo tamaño de lesión que los ratones inmunocompetentes³⁰. Existen varios tipos de linfocitos T con diferentes funciones en las placas ateroscleróticas, como los cooperadores (*helper*, Th), reguladores (Treg) y citotóxicos entre otros⁷⁵. Los linfocitos Th1 y Th2 son los más importantes en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, capaces de inducir cambios fenotípicos y funcionales en otros leucocitos de la respuesta inmune. En general, las citoquinas de la respuesta Th1 dirigen la diferenciación de macrófagos a M1 y las de Th2 favorecen el fenotipo M2^{48, 112}. Los diferentes tipos de linfocitos Th activan la respuesta humoral induciendo la producción de anticuerpos (Ac) por los linfocitos B. Las citoquinas Th1 inducen la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) de isotipo IgG₂, mientras que la respuesta Th2 se asocia con la producción de isotipo IgG₁¹⁸⁰.

2.2. Respuesta inmune humoral.

2.2.1. Inmunoglobulinas e inmunocomplejos.

Las inmunoglobulinas son un grupo de glicoproteínas presentes en el suero y los líquidos intersticiales de los mamíferos. Se conocen cinco isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Difieren unas de otras en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido en carbohidratos. La IgG es la Ig principal en el suero humano y representa el 70-75 % del reservorio total de Ig. Es una proteína monomérica con un peso molecular de 146 kDa y un grado de síntesis de 30 mg/kg/día. Se distribuye de manera amplia y uniforme entre los espacios intravascular y extravascular y representa el Ac principal de la respuesta inmunitaria adaptativa. Se han identificado cuatro subclases de IgG humana: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, que se encuentran en proporciones aproximadas del 66, 23, 7 y 4%, respectivamente.

La estructura de la IgG₁ es el modelo para todas las Ig (Figura 3). Las Ig están compuestas de cuatro cadenas polipeptídicas de dos tipos: la ligera L, que es común y la pesada H, que es estructuralmente distinta para cada clase o subclase de Ig. La cadena ligera está compuesta de una región variable (V_L) y de una región constante (C_L). Mientras que la cadena pesada cuenta con una región variable (V_H) y una región constante compuesta de varias partes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}). Entre ambas cadenas existen puentes disulfuro que sirven de unión. En la Ig distinguimos dos segmentos dependiendo de su diana de unión. Se denomina Fab al segmento que se une al Ag mostrado por las células presentadoras de Ag. La región Fc o región constante es la parte de la Ig que se une al receptor⁶⁷.

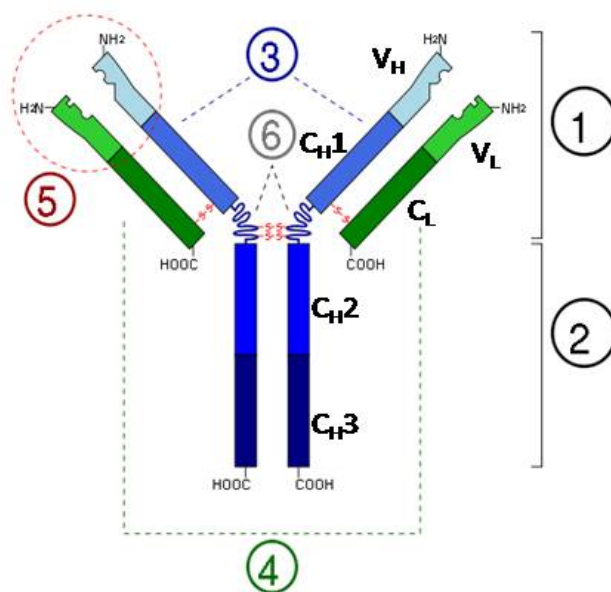


Figura 3: Estructura de las inmunoglobulinas. 1-Región Fab. 2-Región Fc. 3-Cadenas pesadas (azul) con una región variable (V_H), un dominio constante (C_{H1}), una región bisagra y dos regiones constantes más (C_{H2} y C_{H3}). 4-Cadena ligera (verde) con una región variable (V_L) y un dominio constante (C_L). 5-Sitio de unión del Ag. 6-Regiones bisagra.

Las Ig se unen a sus Ag formando agregados llamados inmunocomplejos (IC) que normalmente se eliminan de modo efectivo por el sistema retículoendotelial aunque su acumulación puede desencadenar diversos procesos inflamatorios. Los IC pueden interactuar con el sistema del complemento, provocando la generación de sus proteínas C3a y C5a y la liberación de un gran número de mediadores vasoactivos que aumentan la permeabilidad vascular, además de participar en la inflamación, proliferación, migración y producción de matriz extracelular⁵⁷. Los IC pueden formarse *in situ* por la unión de las Ig a los Ag que se encuentran fijados en los tejidos. Alternativamente, los IC pueden formarse en la circulación y depositarse en diferentes tejidos según sus propiedades químicas^{14, 29, 94}. Por ello, cada vez está cobrando más importancia la idea de que la inflamación depende de la interacción de los IC con sus receptores específicos (FcR) y de la capacidad de los IC de activar el sistema del complemento.

2.2.2. Receptores Fc de inmunoglobulinas.

Existen diferentes clases de receptores capaces de interaccionar con la región constante Fc de las diferentes clases de Ig: el receptor Fc γ R se une a IgG; Fc α R se une a IgA; Fc ϵ R es específico para IgE; Fc μ R para IgM y Fc δ R para IgD. La mayoría de los FcR humanos y murinos son miembros de la superfamilia de las Ig, receptores transmembrana bien caracterizados cuya familia más compleja es la de los Fc γ R¹²¹. Los Fc γ R están presentes en la mayoría de leucocitos y en células residentes de algunos tejidos, incluido el vaso. Estos Fc γ R se presentan como complejos heterooligoméricos que llevan una cadena- α transmembrana de unión al ligando con dos o tres dominios de tipo Ig en la región extracelular¹³³ (Figura 4). Esta cadena se asocia intracelularmente con una o dos subunidades transductoras de la señal, constituidas por las cadenas- γ o ξ , necesarias tanto para la transducción de la señal como para la expresión y acoplamiento de los propios receptores¹¹⁵. Por su función, los Fc γ R se dividen en activadores, asociados a dominios de activación ITAM (motivo de activación de inmunoreceptores basado en tirosina), tales como Fc γ RI y Fc γ RIII; y los inhibidores asociados a dominios inhibidores ITIM (motivo de inhibición de inmunoreceptores basado en tirosina), como el Fc γ RIIB¹¹⁹. En ratón, todos los Fc γ R activadores necesitan la asociación con la cadena- γ que contiene los dominios ITAM necesarios para la transducción de la señal. Estos dominios ITAM interaccionan con tirosina quinasas cuando se activa el receptor, mientras que los ITIM están asociados a fosfatasas¹¹⁹. Además, recientemente se ha descubierto en ratón un nuevo Fc γ R, el tipo IV¹¹⁸, el cual se asocia también a la cadena- γ transductora de la señal y se activa por IC, induciendo vías de señalización intracelular en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células T y B. El primer paso en la activación a través de los Fc γ R es la agregación de estos receptores tras la unión de su ligando, lo que induce rápidamente la fosforilación en tirosina de los dominios ITAM¹¹⁹ y la consiguiente activación de tirosina quinasas (Src y Tec)⁴⁵ y de la familia de quinasas MAPK. Finalmente, la señal de activación de los Fc γ R llega hasta el núcleo, donde se estimula la expresión de determinados genes regulados por factores de transcripción, como el factor nuclear- κ B (NF- κ B), la proteína activadora-1 (AP-1) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT)^{6, 160}.

Se han descrito múltiples funciones fisiológicas mediadas por los Fc γ R, reflejo de su amplia distribución en gran variedad de tipos celulares, entre las que destacan la activación del sistema del complemento, la fagocitosis en macrófagos y neutrófilos, la citotoxicidad celular dependiente de Ac, la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE, la inmunidad en la mucosa mediada por IgA, el transporte de IgG a través de la placenta e inmunidad pasiva al recién nacido y la liberación de mediadores inflamatorios¹⁴².

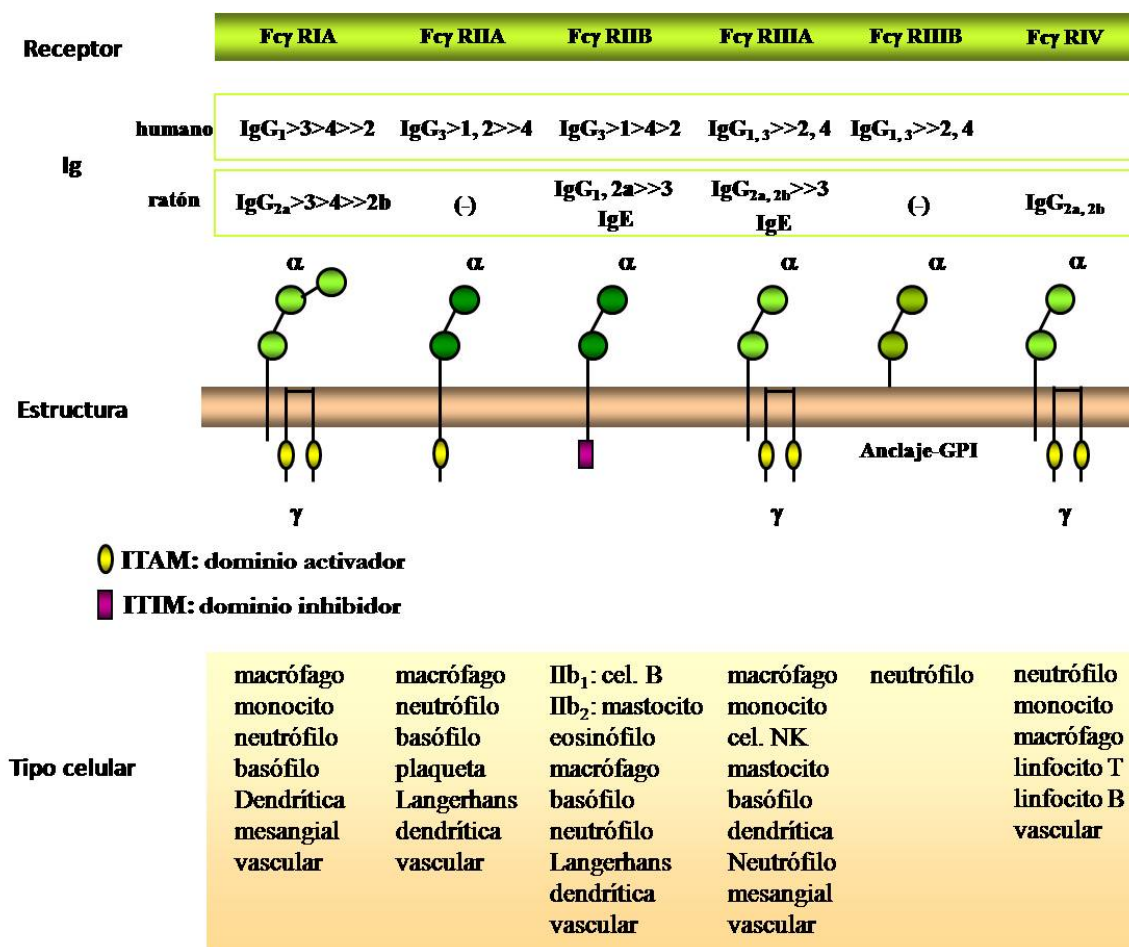


Figura 4: Estructura molecular de receptores Fc de inmunoglobulinas G.

2.2.3. Papel *in vivo* de los FcγR en la inflamación.

Varios estudios han mostrado el efecto beneficioso de la inmunomodulación (por tratamiento con Ig o sus fragmentos) en diferentes enfermedades inflamatorias e inmunes como glomerulonefritis, vasculitis, artritis, lupus y aterosclerosis^{77, 116, 176}. En general, los mecanismos de acción implicados en esta inmunomodulación comprenden la inhibición de la síntesis de Ac en células B, la modulación de linfocitos T, la atenuación del sistema del complemento y la inhibición de la fagocitosis y posterior producción de citoquinas mediante el bloqueo de los FcγR en macrófagos^{44, 71}. Debido a la naturaleza inflamatoria de la lesión ateromatosa, algunos de estos mecanismos podrían explicar el efecto anti-aterogénico que se consigue mediante inmunomodulación farmacológica¹³⁹.

La obtención en los últimos años de animales modificados genéticamente ha puesto de manifiesto que el bloqueo de los FcγR puede ofrecer protección frente a ciertas enfermedades inflamatorias como el lupus, la granulomatosis y la artritis reumatoide^{69, 72, 132, 138}. También se ha asociado la expresión de FcγR con el inicio de la aterosclerosis. Así, ratones ateroscleróticos con

deficiencia en los receptores de tipo activador presentaron una reducción en el tamaño de las lesiones^{66, 103} mientras que la ausencia de receptor inhibidor agravó la enfermedad^{61, 129}. En este sentido, numerosas publicaciones han descrito el amplio abanico de eventos pro-inflamatorios mediados por la activación de FcγR en los macrófagos. Entre ellos se encuentran la inducción de citoquinas (TNF-α, IL-8, CCL2, CCL5, MIP-1β), la activación de mediadores lipídicos y la inducción de enzimas (COX-2, iNOS). Además, los FcγR son los segundos receptores más importantes, después de los receptores basurero, en el aclaramiento de LDLox⁹⁵. Esto indica que las propias LDL modificadas son capaces de inducir la respuesta inmune en la aterosclerosis, ya que tanto en placas como en suero de pacientes se han encontrado auto-Ac contra LDLox (principalmente IgG)^{108, 163}. Este hecho nos sugiere que el aclaramiento de los IC que contienen LDL a través de los FcγR puede contribuir al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Debido a que el macrófago de origen hematopoyético es la célula inmunitaria mayoritaria durante la formación de las lesiones ateroscleróticas, este trabajo investiga el efecto de la deficiencia de FcγR en las células derivadas de médula ósea en el desarrollo de las placas ateroscleróticas de un modelo experimental murino (ratones apoE^{-/-}).

3. Mediadores inflamatorios en aterosclerosis.

3.1. Citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión.

Las citoquinas son péptidos de tamaño comprendido entre 8 y 30 kDa, implicados en gran cantidad de funciones celulares como la señalización intercelular (autocrina, paracrina y endocrina), así como en la activación, proliferación y migración celular. Actualmente se conocen más de 80 citoquinas diferentes y su número continúa creciendo¹⁵. Las citoquinas se agrupan en varias clases: interleuquinas (IL, se han identificado 37 tipos), factor de necrosis tumoral (TNF, la principal es la TNF-α), interferón (IFN, la principal es IFN-γ), factor estimulador de colonias (GM-CSF y M-CSF principalmente), factor de crecimiento transformante (TGF-β) y quimioquinas¹⁵⁸. En función de su actividad se dividen en citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-12, IL-18 e IFN-γ) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-33 y TGF-β), aunque en el caso de alguna citoquina, como IL-6, no termina de estar clara su función debido a que puede jugar diferentes papeles dependiendo del entorno donde actúe³⁹.

Las citoquinas tienen una función clave en diversos procesos fisiológicos y son especialmente importantes en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune innata y adaptativa. Además de su participación en la respuesta a infecciones, las citoquinas tienen una especial relevancia en enfermedades inflamatorias de riñón, vasos y articulaciones, así como en enfermedades autoinmunes neurológicas y endocrinas^{2, 5, 23, 63, 156}.

En las placas ateroscleróticas humanas se ha descrito una gran variedad de citoquinas producidas por las células implicadas en la formación de la placa, que a su vez son capaces de activar estas células¹⁵⁸. Por ejemplo, durante los estadios tempranos de la enfermedad, las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , pueden alterar la función endotelial afectando a la distribución de los complejos cadherina-catenina entre las células vasculares y endoteliales⁷⁸. Esto conduce a la pérdida de uniones intercelulares y disminuye la función de barrera del endotelio, permitiendo así la trans migración de leucocitos. Otras citoquinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) pueden inducir la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión que facilitan la llegada, adherencia y extravasación de monocitos y linfocitos desde la luz del vaso¹⁶⁶. Ya en la capa íntima, los leucocitos pueden ser activados permanentemente por citoquinas (TNF- α e IFN- γ) producidas por las células residentes, lo que acelera la transformación de macrófagos a células espumosas y estimula la expresión de sus receptores *scavenger*⁵. Tanto el aumento de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) como el balance existente entre éstas y las citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) se han considerado de vital importancia en la enfermedad cardiovascular y en particular en la generación de placas ateroscleróticas⁴⁷.

El reclutamiento de células inflamatorias a la capa íntima de la lesión aterosclerótica es un proceso esencial en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis que depende de la producción local de quimioquinas y de la expresión de sus receptores en las células circulantes⁵. Las quimioquinas son una familia de citoquinas de pequeño peso molecular, que se caracterizan por presentar en su estructura cuatro cisteínas en posiciones muy conservadas¹²³. Dentro de esta familia se distinguen cuatro subfamilias en función de la disposición de sus aminoácidos, CXC (IL-8 y Fractalina), CC (CCL2 y CCL5), C (XCL1 y XCL2) y CX₃C (CX3CL1). CCL2 (también conocido como MCP-1) es la principal quimioquina de la subfamilia CC, con un amplio espectro de acción y potente capacidad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T, que además induce en monocitos la expresión de integrinas favoreciendo su migración⁶⁸. Se ha observado una expresión elevada de CCL2 en células del endotelio vascular, CMLV y macrófagos, tanto *in vitro* como en placas ateroscleróticas humanas y de conejo¹⁷⁵. Además, la deficiencia génica del receptor de CCL2 (CCR2) disminuye las lesiones ateroscleróticas en ratón^{8, 31}. CCL5 también pertenece a la subfamilia CC, y es una quimioquina atrayente de células T, eosinófilos, y basófilos, inducible por IFN- γ y cuyo papel es el reclutamiento de leucocitos al entorno inflamatorio. Se ha descrito su presencia en placas ateroscleróticas⁹⁷ y el uso de un antagonista ha demostrado ser capaz de reducir la lesión aterosclerótica¹³.

Las moléculas de adhesión son proteínas involucradas en la unión entre células o con la matriz extracelular durante los procesos de adhesión celular. Funcionalmente se pueden diferenciar tres tipos de moléculas de adhesión. En primer lugar actúan las selectinas (L-, P- y E-selectina) que son las encargadas de “anclar” y reducir la velocidad circulante de los leucocitos del vaso. A continuación se refuerza la unión entre los leucocitos y las células endoteliales

mediante la unión de las integrinas de los leucocitos a las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de las células endoteliales. Finalmente se produce la trans migración de los leucocitos a la zona subendotelial, donde las moléculas de adhesión intercelular facilitan la migración de los leucocitos¹⁰¹.

Es conocido que en la fase inicial de la lesión aterosclerótica, la acumulación de LDLox y diversas citoquinas⁶² puede inducir la expresión de selectinas¹⁷, VCAM-1²⁸ e ICAM-1¹⁴⁶. Por ello, el control del infiltrado celular mediante la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y sus inductores, las citoquinas, es importante en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias.

3.2. El factor de transcripción NF- κ B en la aterosclerosis.

3.2.1. La vía NF- κ B.

La mayoría de las enfermedades humanas, como aterosclerosis, artritis reumatoide, asma, shock séptico, fibrosis pulmonar, diversos tumores y SIDA, se relacionan con una anomalía en la activación y expresión de diversos genes, cuyos productos están implicados en el inicio y progresión de su patogenia¹⁶. En general, estos genes se encuentran en estado quiescente o tienen una mínima actividad, regulando así los procesos biológicos y fisiológicos normales. Sin embargo, en ciertas condiciones como la exposición a contaminantes ambientales, agentes biológicos o químicos, la expresión de estos genes puede aumentar bruscamente. Estos mecanismos están mediados al menos parcialmente por los factores de transcripción. Uno de los factores de vital importancia en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias es el factor nuclear- κ B (NF- κ B). Este factor de transcripción puede ser activado por un gran número de estímulos fisiológicos y no fisiológicos como citoquinas, mitógenos, lipopolisacárido bacteriano, factores de crecimiento, virus, estrés mecánico y oxidativo, radiación ultravioleta y agentes químicos^{25, 50, 80}. NF- κ B es un factor crucial en la regulación de genes durante los diferentes pasos del proceso aterosclerótico y su activación se ha descrito en placas humanas y animales^{41, 70}.

En mamíferos, se han descrito cinco proteínas pertenecientes a la familia de NF- κ B: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B-1) y p52/p100 (NF- κ B-2) (Figura 5). Estas proteínas están presentes en células no estimuladas formando homo o heterodímeros unidos a sus proteínas represoras, denominadas I κ B. Se han descrito siete proteínas de la familia I κ B: I κ B α , I κ B β , BCL-3, I κ B ϵ , I κ B γ y los precursores p105 y p100⁵⁹. Estas dos últimas proteínas son procesadas para dar las formas p50 y p52, respectivamente. Las proteínas I κ B se caracterizan por repeticiones de anquirinas presentes en su extremo C-terminal que son esenciales para su interacción con las proteínas NF- κ B. La familia NF- κ B se caracteriza por la presencia del dominio de homología Rel (DHR) en su secuencia. El dominio DHR se compone de 300 aminoácidos conservados

evolutivamente localizados en el extremo N-terminal de la proteína y es el responsable de la dimerización, interacción con las proteínas I κ B y unión al DNA⁵⁹. Además, este dominio contiene la señal de localización nuclear (SLN) que facilita su translocación al núcleo³⁵. Se ha descrito otro dominio presente sólo en las proteínas p65, RelB y c-Rel, denominado dominio de activación transcripcional (DAT) que es necesario para la activación de sus genes diana.

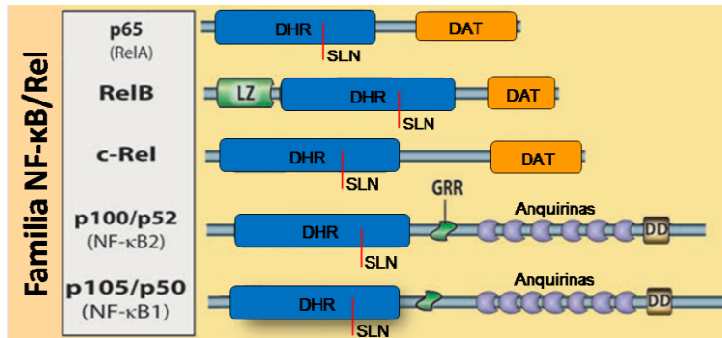


Figura 5: Estructura proteica de la familia NF- κ B (modificado de Hayden y Ghosh 2011⁵⁸)

Existen diversas vías de activación de NF- κ B, cada una constituida por sus dímeros característicos con especificidad para prácticamente cada estímulo y cada tipo celular¹⁷¹. De forma general se han descrito dos vías: una vía clásica, donde el dímero de NF- κ B está constituido por las proteínas p65 y p50 (esta vía es mediada por el complejo de las quinasas IKK, que fosforilan a la proteína represora I κ B) y otra alternativa, donde la quinasa iniciadora se denomina NIK y el dímero de NF- κ B está compuesto de p52 y RelB¹¹⁴.

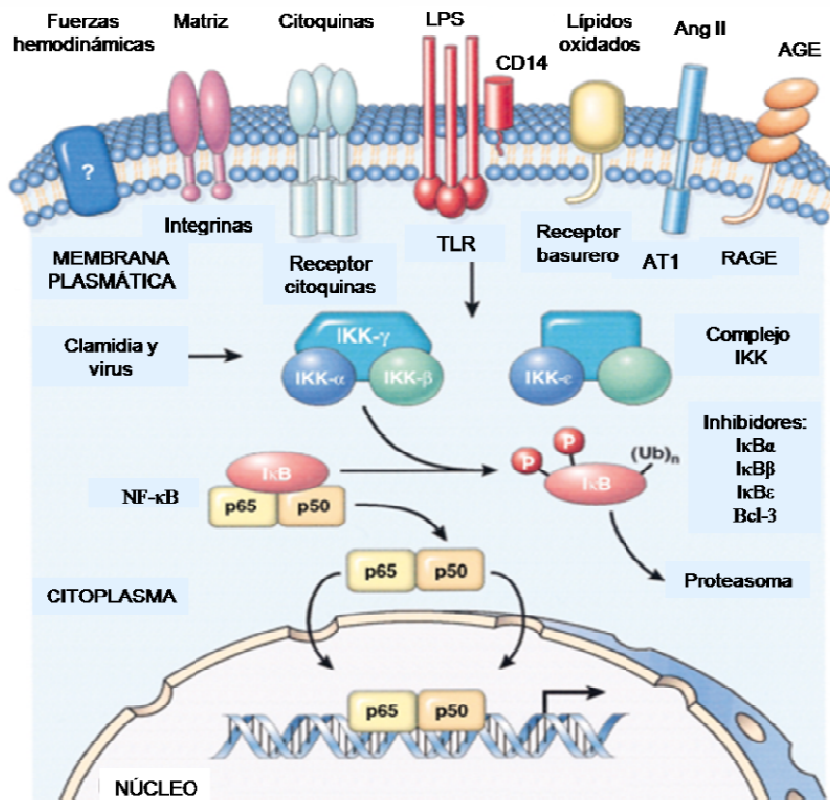


Figura 6: Activación de la vía NF- κ B (modificado de Collins 2001²⁵)

La activación de NF- κ B se produce por diversas cascadas de transducción de señal que se inician generalmente tras la unión del ligando a su receptor (Figura 6). En estado basal, NF- κ B se encuentra mayoritariamente en el citoplasma en su forma inactiva asociada a las proteínas represoras I κ B. La inhibición de NF- κ B se produce principalmente porque la unión de I κ B enmascara su secuencia SLN, lo que impide su translocación al núcleo celular, evitando así su actividad como factor de transcripción.

Uno de los pasos importantes en la activación de la vía clásica de NF- κ B es la fosforilación y degradación de la proteína represora I κ B, mediada por el complejo de quinasas IKK, constituido por las subunidades catalíticas IKK- α , IKK- β y la subunidad reguladora IKK- γ /NEMO. La activación del complejo IKK se produce mediante fosforilación de serinas específicas situadas en su centro activo por la familia MAP3K (NIK, MEKK, NAK) o por autofosforilación tras la unión al propio receptor del ligando (TNF-R1, TRAF2)⁵⁹. El complejo activado IKK fosforila a su vez dos serinas del extremo amino-terminal de la subunidad I κ B, que es entonces ubiquitinada y degradada por el proteasoma 26S¹⁸.

La degradación de I κ B libera los dímeros de NF- κ B que dejan expuestas sus secuencias SLN, lo que permite la translocación nuclear. Una vez en el núcleo, el NF- κ B activo se une a los “elementos κ B” (GGGRNNYYCC, donde R es una purina, Y una pirimidina y N puede ser cualquier base⁸⁰) de los promotores de los genes diana, induciendo así la transcripción de factores pro-inflamatorios como citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α), quimioquinas (CCL2, IL-8, IP-10), factores de crecimiento (PDGF, TGF- β), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectina), enzimas (iNOS, COX-2) y proteínas de fase aguda (ferritina, complemento C4) entre otras muchas^{16, 53, 82, 155, 171}.

3.2.2. Mecanismo de translocación nuclear de NF- κ B.

El núcleo de las células eucariotas está relativamente aislado por la membrana nuclear. Esta doble bicapa lipídica se descompone y recompone durante la división celular pero permanece prácticamente impenetrable durante la interfase entre divisiones. Sin embargo, la membrana nuclear contiene complejos proteicos anclados en la misma que permiten el paso de las proteínas del núcleo al citoplasma y viceversa. Estos complejos proteicos denominados complejos de poro nuclear (CPN) o poros nucleares están compuestos de hasta 30 tipos de proteínas diferentes, conocidas como nucleoporinas. El CPN se divide en tres partes, tal y como se representa en la figura 7. En el lado citoplasmático están las fibrilas citoplasmáticas encargadas de unir las proteínas que se van a translocar. A continuación se encuentra el centro del poro, un túnel que atraviesa las membranas nucleares compuesto por fenilalaninas y glicinas responsables del movimiento de las proteínas a través del poro. Finalmente, en el lado nuclear del CPN se

encuentra la canasta nuclear, que tiene la capacidad de ajustar el tamaño del poro a través del cual pasarán las proteínas.

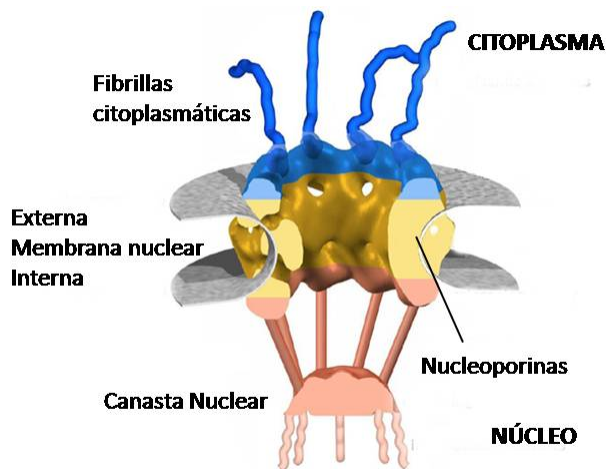


Figura 7: Complejo de poro nuclear (modificado de Mor 2010¹¹¹).

La difusión pasiva de iones y proteínas pequeñas (hasta 25 kDa) se produce sin ayuda de otros participantes, pero las proteínas más grandes necesitan ser transportadas de forma activa y dependiente de energía a través del CPN¹⁶⁴. Para ello, las proteínas que van a ser transportadas dentro o fuera del núcleo contienen en su estructura las secuencias de importación (SLN) y de exportación nuclear, respectivamente. Estas señales de dirección son reconocidas por diferentes receptores solubles encargados del transporte proteico: las importinas para el transporte hacia el núcleo y las exportinas para el transporte hacia el citoplasma. Todos estos receptores son capaces de unirse a la proteína Ran, una GTPasa de la superfamilia de Ras, que produce la energía necesaria para el transporte.

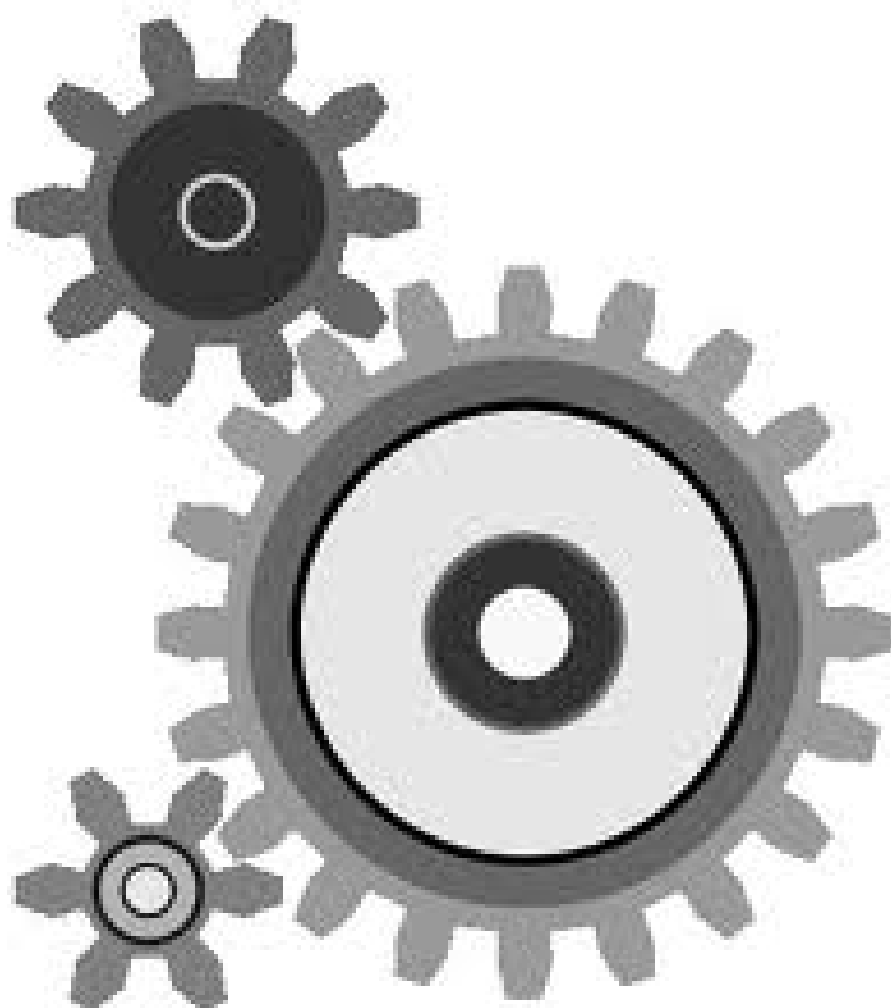
El sistema de transporte nuclear mejor conocido es el sistema clásico de importinas, constituido por una proteína de unión al CPN (importina β) y las moléculas adaptadoras (importinas α) que interaccionan con la subunidad β y la proteína transportada. Hasta ahora se han descrito en mamíferos una importina β y seis importinas α ($\alpha 1$, $\alpha 3$ - $\alpha 7$), ampliamente distribuidas en todos los tipos celulares, excepto $\alpha 6$ que sólo se expresa en testículos. Las múltiples proteínas transportadas se unen con diferente afinidad a las importinas α , lo que produce una gran variabilidad de unión dependiendo del tipo celular y del tejido donde se produce.

Estudios en células cancerosas han demostrado que el dímero p50-p65 es transportado al núcleo específicamente por las importinas $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$, sin participación de $\alpha 1$ o $\alpha 7$ ^{35, 36}. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito en profundidad su mecanismo de translocación nuclear en otros tipos celulares, como macrófagos o CMLV.

3.2.3. Modulación de la activación de NF- κ B en la aterosclerosis.

NF- κ B es un factor crucial para la regulación de la expresión de genes en los diferentes pasos de la aterosclerosis. La activación de este factor controla la producción de citoquinas, quimioquinas, la generación de células espumosas y la migración y proliferación de CMLV, entre otros muchos procesos. Por lo tanto, no es raro observar que la modulación de este factor haya atraído tanto interés en las últimas décadas, convirtiéndose en la diana terapéutica de diversos estudios en aterosclerosis y otras enfermedades. Existe un enorme número de inhibidores de la vía de NF- κ B que pueden ser clasificados según el paso de la vía de activación que bloquean: las IKK, la fosforilación de I κ B, la translocación nuclear, la unión al DNA o la transactivación de genes⁴². En estudios preclínicos, varios grupos incluido el nuestro, han descrito las propiedades anti-inflamatorias de compuestos fitoquímicos (resveratrol, ácidos gálico y boswélico, ebselen, parthenolide, etc) capaces de reducir las lesiones ateroscleróticas en modelos animales^{19, 27, 96}. Algunos de estos compuestos están en fase clínica II/III en varias enfermedades inflamatorias, incluyendo pacientes cardiovasculares⁴⁷. Otros inhibidores dirigidos a prevenir la degradación de I κ B mediante bloqueo del sistema ubiquitina-proteasoma han mostrado interesantes efectos en modelos murinos de inflamación, aunque los resultados en animales hipercolesterolémicos son controvertidos¹⁶¹. Más recientemente, se han desarrollado otros inhibidores sintéticos que inhiben selectivamente el complejo IKK en modelos animales de inflamación¹⁸², aunque sus propiedades ateroprotectoras en pacientes no se han analizado hasta ahora.

Por otro lado, la inhibición farmacológica de la translocación de NF- κ B en otras patologías se ha estudiado mediante el uso de diferentes compuestos, como lactonas derivadas de plantas⁹³, antibióticos²⁰ y diferentes péptidos sintéticos^{79, 86, 91}. A pesar de los prometedores resultados en otras enfermedades inflamatorias (daño corneal, pancreatitis inducida por diabetes y fallo renal inducido por tóxicos), el uso de péptidos inhibidores de la translocación nuclear de NF- κ B en el contexto cardiovascular ha sido utilizado por primera vez en el trabajo que se muestra en esta tesis.



II. Objetivos

Nuestra hipótesis se basa en la consideración de la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria cuyo tratamiento se puede abordar mediante modulación de los procesos inmunes o de las respuestas inflamatorias implicadas. El **objetivo general** es la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en aterosclerosis que reduzcan o prevengan las complicaciones de esta patología.

Objetivo 1. La interacción de los IC con sus receptores específicos FcγR es crucial en el inicio de la respuesta inflamatoria. Los pacientes con aterosclerosis presentan una expresión aumentada de FcγR. Además, los macrófagos son las células del sistema inmunitario innato que mayoritariamente infiltran las lesiones y el balance entre sus diferentes fenotipos modula el proceso de aterogénesis. Por ello, nuestro primer objetivo es analizar las consecuencias que la deficiencia funcional en los FcγR de los monocitos/macrófagos tiene en el desarrollo de la aterosclerosis experimental.

1.1. Estudiar la formación y composición de la placa de ateroma de ratones deficientes en apolipoproteína E trasplantados con células de médula ósea procedentes de ratones deficientes en la cadena-γ de los receptores FcγR activadores (tipos I, III y IV).

1.2. Analizar en macrófagos de las lesiones y sistémicos si la deficiencia en FcγR activadores altera el balance entre los fenotipos de macrófagos (inflamatorio y reparador), así como su capacidad de formar células espumosas y expresar mediadores pro-inflamatorios.

1.3. Estudiar *in vitro* las respuestas dependientes de FcγR activadores en macrófagos derivados de médula ósea y estimulados con IC.

Objetivo 2. El factor de transcripción NF-κB es uno de los principales reguladores de las respuestas inflamatorias durante la aterogénesis y su activación se ha descrito tanto en células circulantes como en las lesiones de pacientes y animales ateroscleróticos. En el segundo objetivo de esta tesis ensayamos un nuevo abordaje terapéutico en la aterosclerosis experimental basado en la inhibición de NF-κB y de los genes que este factor de transcripción regula.

2.1. Caracterizar *in vitro* las propiedades anti-inflamatorias de un péptido con permeabilidad celular que contiene la secuencia de localización nuclear del NF-κB. En células de músculo liso vascular y macrófagos, estudiar los efectos del péptido sobre la translocación nuclear de NF-κB y la expresión de sus genes dependientes, así como sobre la migración y proliferación celular. Identificar los mecanismos moleculares de transporte nuclear bloqueados por este péptido.

2.2. Evaluar *in vivo* el efecto anti-inflamatorio y ateroprotector del tratamiento con el péptido inhibidor de NF-κB en el modelo experimental de aterosclerosis (ratones deficientes en apolipoproteína E alimentados con dieta hiperlipídica). Estudiar el tamaño y composición de las lesiones aórticas, la activación local de NF-κB y la expresión de genes pro-inflamatorios.



III. Material y métodos

1. Estímulos e inhibidores.

1.1. Estímulos.

Los estímulos celulares empleados en esta tesis fueron los agregados de IgG y el LPS bacteriano. Las IgG monoméricas (10mg/mL) de ratón fueron suministradas por Cappel (Cappel/INC, Aurora, Ohio, EEUU). Para la formación de estímulos similares a inmunocomplejos, las IgG monoméricas se agregaron por calentamiento a 63°C durante 30 minutos y se eliminaron los agregados insolubles mediante centrifugación. Los agregados solubles de IgG se utilizaron para estimulación celular pues presentan propiedades fisicoquímicas similares a los IC presentes en lesiones ateroscleróticas humanas⁶¹. Las células se estimularon con 75µg/mL de agregados de IgG o 1µg/mL de LPS durante diferentes tiempos a 37°C.

1.2. Diseño del péptido permeable inhibidor de la translocación nuclear de NF-κB.

Se diseñó y sintetizó el péptido SLN conteniendo la señal de localización nuclear de la proteína p50 de NF-κB (Creative Biolabs, Shirley, NY, EEUU). Este péptido está compuesto por dos secuencias: 1) la región h de la secuencia señal del factor de crecimiento de fibroblastos-4 que le confiere permeabilidad para pasar a través de las membranas celulares; 2) la secuencia SLN de la proteína p50 (parte del dímero clásico y mayoritario de NF-κB) que compite con los factores de transcripción activados para unirse a la maquinaria de translocación al núcleo. Además, flanqueando la señal SLN de p50 se introdujeron dos cisteínas para generar un puente disulfuro que aumenta la permeabilidad del péptido¹⁷² (Figura 8). Como control estructural se utilizó un péptido mutado (M-SLN) con la misma secuencia que el péptido inhibidor SLN salvo un cambio de dos aminoácidos en la región SLN. Los péptidos se resuspendieron en 2.5% acetonitrilo en agua para su uso *in vitro* (4-54µM, preincubación 90 min) e *in vivo* (0.13 µmol/inyección).



Figura 8: Secuencia del péptido SLN en código de aminoácidos de letra única.

2. Cultivos celulares.

2.1. Cultivo de células de músculo liso vascular de ratón.

Las CMLV murinas se obtuvieron a partir de ratones de fenotipo salvaje (C57BL/6) de entre 12-16 semanas de edad siguiendo el protocolo descrito previamente⁹⁶. Se extrajeron las aortas y se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido. Los vasos se trocearon en piezas de 1mm y se incubaron con 4mg/mL de colagenasa tipo II (290U/mg; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) resuspendida en medio DMEM suplementado con 100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina y 2mM glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) durante 45min a 37°C. La reacción se paró añadiendo un 10% de suero fetal bovino (SFB, Lonza, San Francisco, EEUU) al medio. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en DMEM con 10% SFB, se sembraron en frascos de cultivo de 25cm² y se incubaron a 37°C en una estufa humidificada y con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y se utilizaron entre el tercer y séptimo pase. La caracterización de las CMLV se realizó mediante inmunohistoquímica y microscopía de contraste de fase. De esta forma, las CMLV se caracterizaron por presentar tinción positiva para α -actina (Sigma) y negativa para factor VIII e Ia (Dako, Glostrup, Dinamarca) excluyendo la presencia de células endoteliales y macrófagos, respectivamente.

2.2. Cultivo de macrófagos de ratón.

2.2.1. Extracción de macrófagos peritoneales.

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones hembra de 4 meses mediante lavado peritoneal. Brevemente, los ratones anestesiados recibieron una inyección intraperitoneal de 10mL de suero salino estéril y, tras 5 minutos de masaje abdominal, se extrajo el contenido peritoneal. Las células peritoneales se sembraron en placas con medio de cultivo, se incubaron durante 2 horas para permitir su adhesión y posteriormente se lavaron y se estimularon.

2.2.2. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea.

Los macrófagos derivados de médula ósea se obtuvieron de ratones hembra de 4 meses. Después de la anestesia y sacrificio, se extrajo la médula de tibias, fémures y húmeros de cada ratón con medio DMEM frío y la suspensión celular se sembró en placas de cultivo con medio DMEM con 100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina y 2mM glutamina y 10% SFB. Además, para inducir la diferenciación, se añadió un 10% de medio condicionado de L-929, células productoras de la citoquina M-CSF (concentración aproximada en el medio 400pg/ml⁷⁶).

Tras 7 días de diferenciación en estas condiciones, las células de médula ósea convertidas en macrófagos son capaces de adherirse a las placas de cultivo, por lo que es sencillo eliminar las células en suspensión no diferenciadas mediante lavados.

2.2.3. Línea de macrófagos murinos RAW 264.7.

La línea de macrófagos de ratón RAW 264.7 (TIB-71; American Type Culture Collection, Manassas, VA, EEUU) se mantuvo en cultivo con medio DMEM con /mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina y 2mM glutamina y 10% de SFB.

2.3. Cuantificación de células espumosas.

El contenido lipídico en los macrófagos peritoneales se determinó por tinción con Oil-red-O/hematoxilina en células sembradas en cubres de cristal. Se contabilizó el número de macrófagos totales (9 puntos al azar en cada cubre) distinguiéndolas por diferencias morfológicas y se consideraron células espumosas aquellas que contenían 4 o más gotas lipídicas en su interior. Los resultados se expresaron como porcentaje de células espumosas respecto del número total de macrófagos.

2.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.

La viabilidad celular en las condiciones experimentales estudiadas se analizó mediante ensayo con MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan, Sigma). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y tras su estimulación, se tiñeron con MTT (0.1 mg/mL) y se midió la absorbancia del MTT metabolizado a $\lambda=600\text{nm}$.

La proliferación se determinó en placas de 96 pocillos mediante el método colorimétrico del azul de metileno. Las células se fijaron en 10% de formol en PBS, se tiñeron con 1% azul de metileno y se lavaron con tampón borato 0.01M. Una vez seca la placa, se eluyó el colorante con 100µL de etanol en HCl 0.1M (1:1) y se leyó a $\lambda=620\text{nm}$.

2.5. Ensayos de migración.

La capacidad migratoria de CMLV y macrófagos murinos RAW 264.7 se midió mediante dos aproximaciones diferentes. En los experimentos de cierre de heridas (*wound-healing*) se sembraron 3×10^5 CMLV en placas de 12 pocillos, se deplecionaron en medio con 0.5% de SFB durante 24 horas y posteriormente se realizaron hendiduras de 1mm con una punta de pipeta de plástico. Las células se mantuvieron a 37°C en las diferentes condiciones experimentales. Para

determinar la velocidad de cierre de las hendiduras, se capturaron imágenes (6 por pocillo) a diferentes tiempos (4, 8, 24h) mediante microscopía óptica. Las áreas libres de células se cuantificaron (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EEUU) y se normalizaron respecto al tiempo inicial.

En los experimentos de trans migración (placas *transwell* de 24 pocillos), se resuspendieron 3×10^5 CMLV deplecionadas y se colocaron en la parte superior de los insertos (*transwell* de $8 \mu\text{m}$ de poro, Corning, Corning, NY, EEUU). En la parte inferior se añadió medio DMEM conteniendo los estímulos e inhibidores y se permitió migrar a las CMLV hacia estos pocillos durante 12 horas a 37°C . Las células adheridas al otro lado de la membrana porosa se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con cristal violeta al 0.2% y se cuantificaron tres campos al azar para cada inserto. En otros experimentos, se realizaron cocultivos de macrófagos RAW 264.7 con CMLV. Para ello, se sembraron 5×10^5 macrófagos deplecionados en la parte superior de los *transwel* y se pusieron en contacto con una monocapa de CMLV en la parte inferior de la placa. Las CMLV se estimularon y se permitió la migración de los macrófagos hacia las CMLV durante 8 horas a 37°C . La cuantificación del número de células migradas se realizó tras tinción con cristal violeta.

3. Modelos animales de aterosclerosis.

3.1. Animales empleados.

Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo con la normativa internacional vigente (B.O.E 223/1988 y 265/1990) y fueron aprobados por el comité ético de nuestra institución. Se utilizaron ratones de tres genotipos: salvajes (C57BL/6), deficientes apoE^{-/-} (cepa C57BL/6 Jackson laboratory, Bar harbor, ME, EEUU) y dobles deficientes $\gamma^{-/-}$ apoE^{-/-} generados previamente en nuestro laboratorio mediante retrocruzamiento durante 7 generaciones de ratones $\gamma^{-/-}$ y apoE^{-/-61}.

3.2. Trasplante de médula ósea.

Para el trasplante de células de médula ósea se emplearon ratones macho donantes (apoE^{-/-} y $\gamma^{-/-}$ apoE^{-/-}) y receptores (apoE^{-/-}) de 12-14 semanas de edad. Se recogió la médula ósea de tibias, fémures y húmeros de los ratones donantes y se trató con solución de Gay para eliminar células rojas que podrían inducir daño vascular (trombosis). Tras varios lavados, se trasplantaron por la vena caudal 1×10^7 células a los ratones receptores, que previamente habían sido irradiados con 8 Grays de rayos X, protegiendo la zona renal con placas de plomo. Como todos los ratones utilizados contienen la misma carga genética, no presentaron síntomas de rechazo. Una vez

trasplantados, los animales se mantuvieron en jaulas aisladas del exterior, con agua estéril y comida irradiada (dieta estándar) durante 4 semanas y posteriormente se alimentaron durante 10 semanas con dieta hiperlipídica (21.2% de grasas, (0.15% colesterol y 17.3% de proteínas; Harlan, Indianapolis, Indiana, EEUU). En estos estudios generamos dos tipos diferentes de quimeras (Figura 9):

apoE→apoE controles (médula ósea de apoE^{-/-} a ratones apoE^{-/-} irradiados, N=17).

γapoE→apoE (médula ósea de γ^{-/-} apoE^{-/-} a ratones apoE^{-/-} irradiados, N=22).

El cambio en el genotipo de las células sanguíneas de las quimeras apoE→apoE y γapoE→apoE se determinó a las 4 semanas del trasplante mediante PCR de DNA purificado de sangre periférica. Las condiciones de la PCR genómica para el gen de la apolipoproteína E fueron: 94°C, 1min; 58°C, 1 min; 72°C, 1.5 min; 40 ciclos. Empleamos los cebadores específicos Omir-180 (5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3'), Omir-181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3') y Omir-182 (5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3'). Las condiciones de la PCR para el gen de la cadena-γ de los FcγR fueron: 94°C, 1min; 61°C, 1 min; 72°C, 1.5 min; 30 ciclos. Empleamos los cebadores específicos exón 3 (5'-GGAATTCGCTGCCTTTCGGACCTGGAT-3'), exón 2 (5'-GGAATTCGATGCTGTCCTGTTTTTGTA-3') y neo γ (5'-GCCAACGCTATGTCCTGATAG-3'), en el que el exón 2 está reemplazado¹²⁶. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1%.

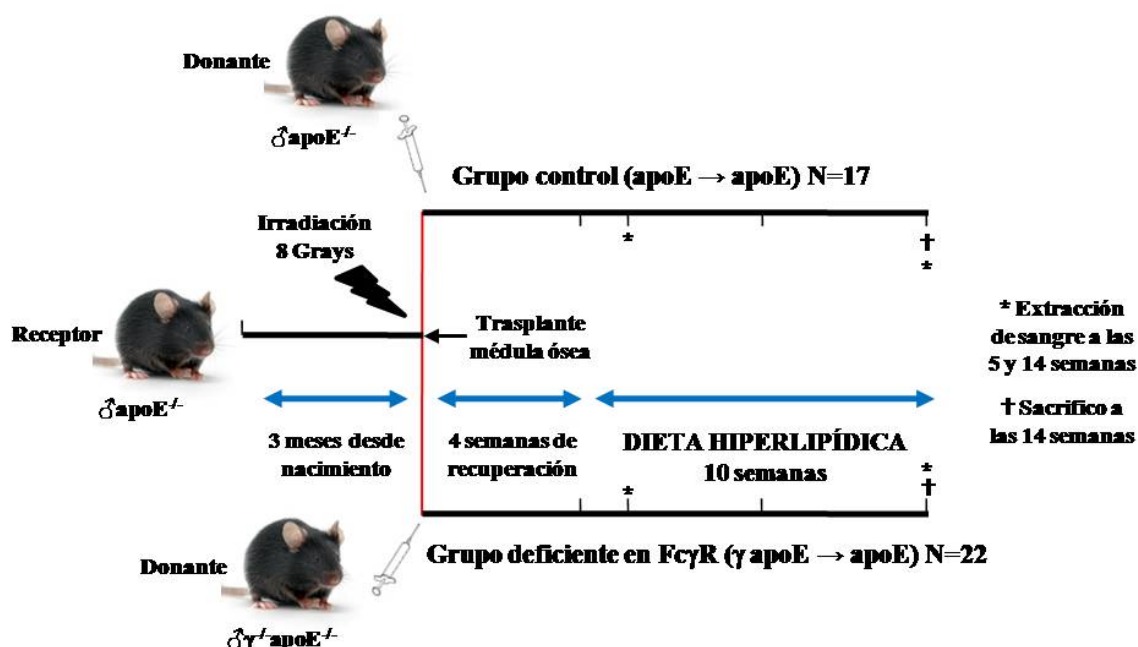


Figura 9: Esquema del modelo experimental de aterosclerosis en ratones quimera con trasplante de médula ósea.

3.3. Tratamiento de la aterosclerosis experimental con el péptido permeable SLN.

Se emplearon como modelo experimental de aterosclerosis los ratones deficientes en el gen apoE (machos, 8 semanas) divididos en dos grupos: I) Control, tratados con el vehículo del péptido SLN (N=9); II) Tratados con péptido SLN ciclado ($0.13\mu\text{mol}/\text{día}$, i.p.), 3 veces por semana durante 4 semanas (N=9). Los ratones se mantuvieron con dieta hiperlipídica durante las 4 semanas de tratamiento (Figura 10).

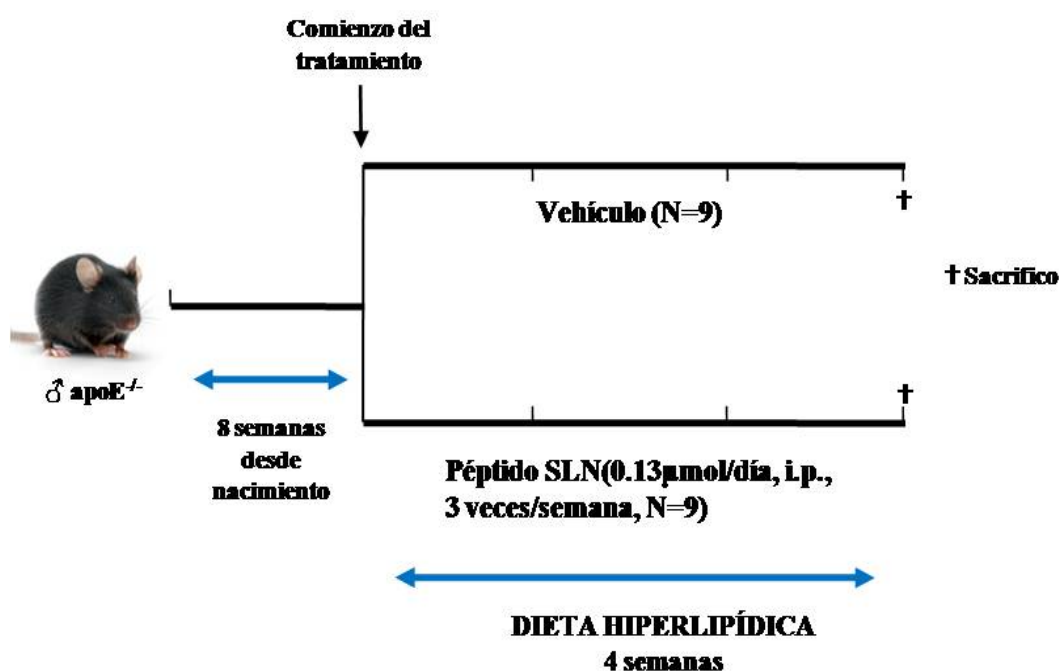


Figura 10: Esquema del modelo de aterosclerosis experimental en ratones $\text{apoE}^{-/-}$ y su tratamiento con el péptido SLN.

4. Análisis histológico.

4.1. Procesamiento de tejidos.

En el momento del sacrificio, los ratones se anestesiaron con una mezcla 2:1 de Ketolar (Pfizer, Nueva York, EEUU) y Rompun (Bayer, Leverkusen, Alemania). Se tomaron muestras de sangre a través del plexo orbital, tras lo cual se expuso la cavidad abdominal y se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero salino, realizando una punción de escape en la vena cava inferior. Se extrajo la aorta desde el corazón hasta la bifurcación, se limpió de tejido graso adherido y se dividió en dos secciones: el tercio más cercano al corazón (arco aórtico) se incluyó en OCT (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, EEUU) para su congelación y posterior

histología y los otros dos tercios (torácico y abdominal) se guardaron en N₂ líquido para estudios de expresión génica. Se extrajeron también muestras de hígado, riñón y bazo que fueron guardados en N₂ líquido. Se realizaron medidas de colesterol sérico mediante el kit amplex red cholesterol assay (Invitrogen) y de triglicéridos mediante un método colorimétrico de Sigma.

4.2. Histología e inmunohistoquímica.

Para poder cuantificar de forma similar todas nuestras muestras, se hicieron cortes seriados de 8µm desde el corazón, tomando como origen la muestra en la que las tres válvulas aórticas eran distinguibles. Las muestras de aorta incluidas en OCT se fijaron durante 10min en acetona fría. Para la detección de los lípidos en las lesiones, las aortas se tiñeron con Oil-Red-O (Sigma) y hematoxilina (Merck). Para las inmunohistoquímicas de MOMA-2, α -actina y CCL2, la actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante tratamiento con 3% H₂O₂ : metanol (1:1) durante 30min. Seguidamente, se eliminaron las uniones inespecíficas tratando los cortes con una solución de PBS que contenía 4% de BSA (Sigma) y suero del huésped en que se obtuvo el Ac secundario. Los cortes se incubaron entonces a 4°C durante toda la noche con el Ac primario (diluido en PBS con 4% BSA y 1-3% suero, Figura 11). Tras lavar las muestras, se añadieron los Ac secundarios conjugados con biotina, diluidos en PBS con 4%BSA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se trataron con el complejo avidina-biotina (ABcomplex; Dako) durante 30min. En todos los casos la localización del Ac se determinó utilizando DAB como cromógeno. Para descartar la existencia de tinción no específica, se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el Ac primario. Las muestras se montaron en gelatina glicerizada de Kaiser (Merk, Damstadt, Alemania). En el caso de la inmunohistoquímica para linfocitos T (CD4⁺) los cortes de aorta de ratón se fijaron en acetona fría y se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en solución de bloqueo PBS conteniendo 1% BSA, 0.1% gelatina, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0.05% azida sódica y 6% suero de la especie del Ac secundario. El Ac frente a CD4 diluido en PBS conteniendo 1% BSA, 0.1% gelatina y 0.05% azida sódica se incubaron durante toda la noche a 4°C, tras lo cual se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con 0.3% H₂O₂ en metanol durante 20min a temperatura ambiente. En este caso, el Ac secundario utilizado se diluyó en PBS. Para las inmunofluorescencias de arginasas (Arg1 y Arg2) en tejido se utilizaron Ac secundarios conjugados a Alexa-488 (8-(6-aminohexil) aminoadenosina 3',5'-monophosphato cíclico, bis(trietilammonio), Invitrogen) y se contrastaron los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) antes de montar las preparaciones con Fluorsave (Calbiochem-Merck, Alemania).

Bloqueo (% Suero)	Anticuerpo Primario		Anticuerpo Secundario	
	Frente a	µg/ml	Frente a	Dilución
10% oveja ¹	MOMA-2 ²	0,6	IgG rata-Biotina ⁶	1/1000
8% caballo ¹	MCP-1 ³	6,7	IgG cabra-Biotina ⁶	1/500
4% oveja ¹	CD4 ⁴	20	IgG rata-Biotina ⁶	1/400
10% cabra ¹	α-actina ⁵	2	IgG ratón-Biotina ⁶	1/200
3% oveja ¹	Arginasa-2 ³	20	IgG conejo-Alexa 488 ⁷	1/200
3% Oveja ¹	Arginasa-1 ³	20	IgG oveja-Alexa 488 ⁷	1/200

Figura 11: Anticuerpos utilizados. Los Ac y los sueros fueron administrados por: ¹Chemicon International, Temecula, CA, EEUU; ²Serotec, Oxford, Reino Unido; ³Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU; ⁴BD Biosciences, Erenbodegem, Bélgica; ⁵Sigma; ⁶Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido; ⁷Invitrogen.

4.3. Southwestern *in situ*.

Para detectar en los tejidos la distribución del factor de transcripción NF-κB activado empleamos la técnica de Southwestern *in situ*⁶⁰. Los oligonucleótidos que contenían la secuencia consenso de NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Promega, Madison, EEUU) y su secuencia complementaria se dimerizaron a 80°C durante 2min y se marcaron con digoxigenina empleando la transferasa 3'-terminal (Roche, Barcelona, España). Los cortes de tejido incluidos en OCT se trataron durante 25min con cloroformo, se fijaron con 0.5% paraformaldehído y se trataron secuencialmente con 5mM levamisol en PBS (30min a temperatura ambiente) y con 0.1 mg/mL DNAsa I (Roche) en tampón HEPES-BSA (10mM HEPES, 40mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.25% BSA pH 7.4; 30min a 30°C). Las muestras se lavaron y se incubaron con 6-12pmol de la sonda marcada diluida en tampón HEPES-BSA conteniendo 2µg/mL poly(dI-dC) durante toda la noche a 37°C. El color se desarrolló por incubación con Ac anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato NBT/BCIP (Roche). La reacción se paró lavando con 10mM Tris pH 8.0 y 1mM EDTA, y los cortes se montaron con gelatina glicerina. Como controles de especificidad de la técnica, empleamos un exceso de 200 veces de oligonucleótido no marcado o la sonda mutada (5'-AGTTGAGGCTCCTTTCCCAGGC-3') marcada con digoxigenina.

4.4. Cuantificación de tinciones.

La cuantificación del tamaño de las lesiones ateroscleróticas se realizaron empleando el microscopio Eclipse 4000 (Nikon) y el software MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Los valores de las áreas medidas se expresaron en μm^2 . La cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas/Southwestern se llevó a cabo por análisis computarizado con el sistema de análisis de imagen semiautomático Image-Pro Plus. Las secciones de aorta teñidas con los Ac u oligonucleótidos se digitalizaron empleando una cámara DXM 1200F (Nikon) conectada al sistema de análisis de imagen. Los valores se expresaron como porcentaje de tinción positiva/área de lesión en la capa neointimal, salvo los linfocitos T CD4⁺, que se representaron como número de células positivas/área de lesión.

5. Análisis de proteínas.

5.1. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

5.1.1. Extracción de proteínas nucleares.

Para la extracción de proteínas nucleares, las células se despegaron de las placas de cultivo, se resuspendieron (tampón 10mM HEPES pH 7.8, 15mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT y 1mM PMSF) y se homogeneizaron. La fracción nuclear se separó de la citosólica mediante centrifugación durante 10min a 12000rpm, se resuspendió en el mismo tampón y se incubó durante 45min a 4°C con KCl a una concentración final de 0.39M, originando así la ruptura de la membrana nuclear. Después, los núcleos se centrifugaron a 12000rpm durante 1h y los sobrenadantes fueron dializados frente a 50mM HEPES pH 7.8, 50mM KCl, 10% glicerol, 0.2mM EDTA, 1mM DTT y 1mM PMSF. El contenido proteico se cuantificó empleando el método del BCA (Amersham).

5.1.2. Ensayo de unión al DNA.

Los oligonucleótidos que contenían la secuencia consenso de unión del factor de transcripción NF- κ B se marcaron con 10 μ Ci de γ -[P³²]-ATP (3000Ci/mmol, Amersham) empleando 10U de T4 polinucleótido quinasa (Promega) en 70mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂ y 5mM DTT. Los extractos nucleares (5-10 μ g) se incubaron durante 20min con 0.035pmoles del oligonucleótido marcado en tampón de unión (10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM MgCl₂, 4% glicerol, 0.5mM EDTA, 0.5mM DTT) que contenía 50 μ g/mL poly (dI-dC) (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La reacción se paró añadiendo tampón de carga (250mM Tris-

HCl pH 8.3, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% xileno cianol, 30% glicerol). Los complejos proteína-DNA se separaron del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturante de poliacrilamida al 4%. Los geles se secaron, se autorradiografiaron y se cuantificaron (Quantity one, Bio-rad, Hercules, CA, EEUU). Como control de especificidad de la reacción de unión se realizaron ensayos de competición, incubando las muestras con un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado. Además, se realizaron controles negativos, omitiendo el extracto nuclear.

5.2. Western blot.

La extracción de proteínas nucleares se realizó de la forma descrita en los ensayos de EMSA. Estas proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon P; Millipore Co., Bedford, MA, EEUU). Las membranas se bloquearon en 1 mM Tris pH 7.5, 10mM NaCl y 1% Tween 20 (Sigma) con leche desnatada al 4% y a continuación se incubaron con 0.4 µg/mL de Ac anti-p65 (Santa Cruz) 16 h a 4°C. Tras sucesivos lavados, se añadió el Ac secundario conjugado con peroxidasa, detectando las bandas mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL y exposición a películas de rayos X (Amersham). Como control de carga interno, se determinaron los niveles de lámina B y β -actina (ambas a 0.4 µg/mL, Santa Cruz) en las membranas utilizadas.

5.3. Ensayo de unión proteína-proteína (*pull-down*).

Las isoformas de la proteína importina ($\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$) unidas a glutatión-S- transferasa (GST) se expresaron en bacterias *E. coli* mediante inducción con 1mM isopropil-1-tiol- β -D-galactopiranosido (IPTG) y 2% etanol³². Se lisaron las bacterias, se centrifugaron y posteriormente, las proteínas de fusión importina-GST se unieron a bolas de glutatión sefarosa-4B (Amersham). Las proteínas retenidas se eluyeron con glutatión reducido 10mM (Sigma) en buffer Tris-HCl 50mM y se dializaron frente a buffer HEPES con 200mM NaCl y 5% glicerol. Para los experimentos de *pull down*, se incubaron 15µg de importina-GST durante 12 horas a 4°C con bolas de glutatión sefarosa-4B en buffer-L (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM NaVO₄ e inhibidores de proteasas; modificado de Fagerlund 2005³⁵). A continuación, se añadieron 30µg de proteínas nucleares y se mantuvieron en rotación a 4°C durante 2 horas antes de ser lavados con buffer-L. Finalmente se hirvieron los lechos en buffer de carga Laemmli, y las proteínas se corrieron en geles de acrilamida. Estos geles se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los Ac para p65 y GST (control de carga).

5.4. Inmunofluorescencia en células.

Las CMLV crecidas en portaobjetos con 4 cámaras tratados para crecimiento celular (Falcon, Labware; Oxnard, California, EEUU). Las células procedentes de distintas condiciones experimentales se lavaron y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10min, se permeabilizaron las membranas con 0,5% Triton X-100 durante 10 min, y tras ser bloqueados con 6% de suero de oveja en PBS-4%BSA, fueron incubados durante toda la noche con 2,7µg/ml de Ac anti-p65 (Santa Cruz). A continuación fueron lavados e incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC (Sigma) durante una hora y se tiñeron los núcleos con DAPI. Finalmente después de lavar abundantemente, las células se montaron en FluorSave (Calbiochem) y el análisis se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia Eclipse 4000 (Nikon).

5.5. ELISA.

La concentración de la quimioquina CCL2 se determinó en los sobrenadantes celulares mediante ELISA comercial (Mouse MCP-1 ELISA Set, BD Biosciences) utilizando una curva estándar de CCL2 recombinante. La detección se realizó con el sustrato TMB y se midió la absorbancia a $\lambda=450\text{nm}$ en un espectrofotómetro de microplacas. Los valores se expresaron en ng/ml.

La concentración de inmunoglobulinas totales en el suero de los ratones se determinó mediante ELISA sandwich empleando kits comerciales para IgM, IgG, IgG₁, IgG_{2a/c} e IgG₃ de ratón (BD Biosciences). Diseñamos también un método ELISA para la titulación de anticuerpos específicos de LDLox, empleando microplacas recubiertas de LDL nativa y LDLox (1mg/mL). Ambas lipoproteínas procedentes de suero humano fueron proporcionadas por el Dr. J.A. Moreno (IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid) y se conservaron en tampón PBS con 1 mg/mL EDTA bajo atmósfera de N₂ y a 4°C. Las placas se recubrieron con 50µg de LDL nativa o LDLox, se bloquearon con 1% BSA y se incubaron con los sueros de ratón (dilución 1:60 para detección de IgG y 1:200 para IgM; 2h a temperatura ambiente), seguido de los Ac primarios anti-Ig de ratón (BD Biosciences), los Ac secundarios conjugados con peroxidasa y la posterior reacción colorimétrica con sustrato. Para cada muestra de suero, los niveles de Ig específicas para anti-LDLox se calcularon por la diferencia de absorbancias ($\lambda=450\text{nm}$) de las placas con LDL nativa y LDLox.

6. Análisis de RNA.

6.1. Extracción RNA.

El RNA total se extrajo de tejido aórtico de ratones y de células en cultivo mediante el método del Trizol (TRI Reagent, Sigma-T9424). La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia a 260nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40µg/mL de RNA. Finalmente se comprobó que la relación entre la absorbancia a 260 y 280 era cercana a 2, indicativo de ausencia de contaminación proteica.

6.2. PCR cuantitativa a tiempo real.

En primer lugar se realizó una transcripción inversa en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc.), con el objetivo de obtener cDNA a partir de 1.5µg de RNA de las muestras, siguiendo las indicaciones de High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, EEUU) resumidas como: 10 min a 25°C, 2 h a 37°C y 5 min a 85°C.

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 usando una TaqDNA polimerasa activada por temperatura (Amplitaq Gold) y cebadores comerciales disponibles en la base de datos de Applied Biosystems (Figura 12). Después de un periodo inicial de 2 min a 50°C y de 10 min a 95°C, las muestras pasaron por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C. Como controles internos se realizó la amplificación del RNA de GAPDH en paralelo con el gen de interés o de 18S en el mismo pocillo del gen de interés. Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos de los transcritos controles. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Los datos se analizaron usando el programa informático 7500 System SDS Software V1.2b1c3 suministrado por el fabricante (Applied Biosystems).

En los casos en que se utilizaron sondas no comerciales, se diseñaron mediante el software Primer-BLAST (NCBI-NIH) y se sintetizaron por Fisher Scientific (Figura 12). Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron con la polimerasa suministrada en la mezcla SYBR Premix Ex Taq (Takara) según las instrucciones del fabricante y utilizando un programa de tres pasos (2 min a 50°C; 5min a 95°C; 1min a 94°C, 40s a 60°C y 40s a 72°C) más uno de disociación de los cebadores (15s a 98°C). La utilización de controles y el análisis de datos se realizó igual que con los cebadores comerciales.

Gen	Código del cebador	Especie
18S-VIC ¹	4310893E	Eucariota
GADPH ²	Mn99999915_g1	Ratón
CCL2 ²	Mm00441242_m1	Ratón
CCL5 ²	Mm01302428_m1	Ratón
ICAM-1 ²	Mm00516023_m1	Ratón
IL-6 ²	Mm004461908_m1	Ratón
TNF- α ²	Mm00443258_m1	Ratón
Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
Arginasa 1 ³	TTAGGGTTACGGCCGGTGGAGAGGA	TGCTGCATGTGCTCGGGCTGT
Arginasa 2 ³	TTGGCCTGAGAGATGTGGAGCCTCC	ACTCAGGTGGATTGGCCTCTGCC
18S ³	CCGTCGTAGTTCGACCATAA	CAGCTTTGCAACCATACTCCC

Figura 12: Tabla de cebadores para PCR a tiempo real (¹VIC, ²FAM o ³Sybr Green)

7. Medida de estrés oxidativo.

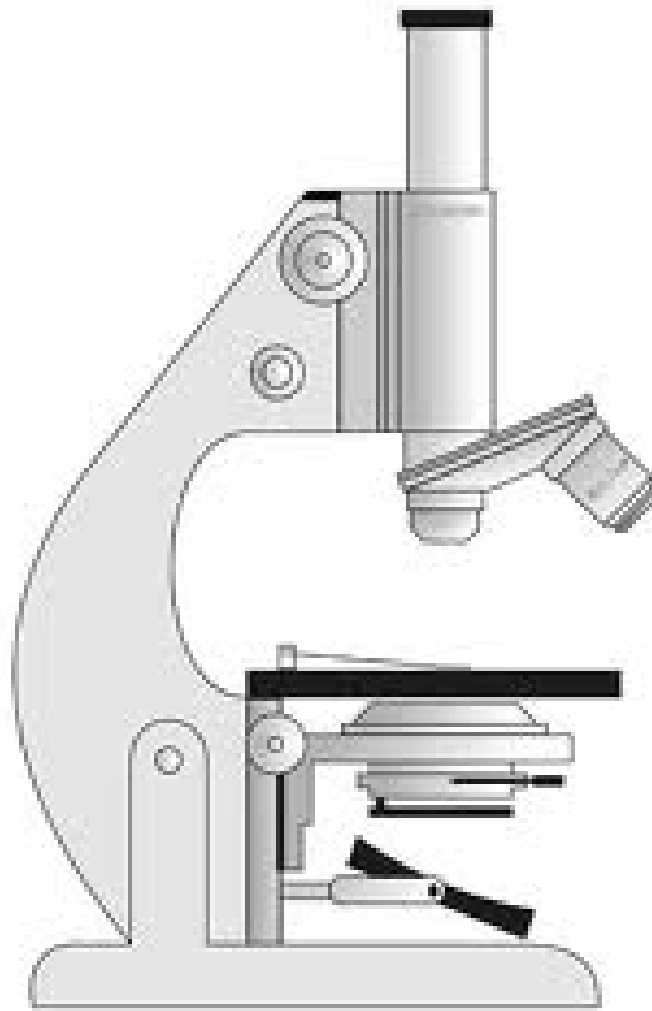
La producción de ion superóxido inducida por las distintas condiciones de estimulación en los cultivos celulares se determinó por medida de la actividad NADPH oxidasa. Las células estimuladas se resuspendieron en solución Krebs-Ringer-HEPES (10 mM HEPES pH 7.4, 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ y 2mM glucosa) y se transfirieron a tubos Röhrren. La reacción quimioluminiscente se inició por adición del reactivo lucigenina (5 μ M) y el sustrato NADPH (100 μ M). La emisión de luz por oxidación de la lucigenina se cuantificó cada 20 segundos durante 10 min en un luminómetro Sirius (Berthold). La producción de ion superóxido se expresó en unidades de quimioluminiscencia relativas por mg de proteína celular.

8. Análisis estadístico

Todas las valoraciones se determinaron en duplicado o triplicado. Para los estudios *in vitro* se realizaron más de tres cultivos independientes. Los resultados de los análisis de niveles de proteína y RNA corregidos por sus respectivos controles internos, se expresan en unidades

arbitrarias o como incremento respecto al control (n-veces). Los datos se expresan como media \pm error estándar, como diagramas de cajas, o como resultado representativo de varios experimentos.

Los análisis de correlación se realizaron con el programa Prism 5 (Graphpad Software, La Jolla, EEUU). El análisis estadístico se realizó empleando los tests de ANOVA o Tukey-Kramer para comparación entre las variables, considerando diferencias significativas aquellas con valores de $p < 0.05$.



IV. Resultados

PARTE I: PAPEL DE LOS FcγR DE LEUCOCITOS EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL.

El papel de la inmunidad innata y adaptativa en el desarrollo de la aterosclerosis es un campo de estudio en constante avance. La inmunomodulación para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, entre ellas la aterosclerosis, ha sido estudiada en pacientes y animales con resultados muy prometedores^{81, 140}. En un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que ratones deficientes en los receptores FcγR activadores, encargados de la eliminación de inmunocomplejos formados por IgG y LDL modificadas, estaban parcialmente protegidos de la generación de lesiones ateromatosas. Además, demostramos la implicación directa de los FcγR en diversos procesos inflamatorios relacionados con la aterogénesis⁶¹. Se ha demostrado que las células infiltrantes, sobre todo los monocitos/macrófagos, tienen un papel clave en el desarrollo y progresión de la placa de ateroma³⁹. Por lo tanto, el objetivo de esta primera parte de la tesis fue estudiar el efecto de la deficiencia de los FcγR limitada a las células infiltrantes de origen hematopoyético. Para ello, realizamos estudios *in vivo* de trasplante de médula ósea de ratones deficientes en FcγR y estudios *in vitro* con macrófagos derivados de médula ósea.

1. Estudios *in vivo*: Trasplante de médula ósea en ratones.

El uso de ratones deficientes en apolipoproteína E como modelo de aterosclerosis nos permite estudiar lesiones semejantes a las lesiones humanas, así como la generación de dobles deficientes en otros genes para estudiar sus efectos en el desarrollo de esta enfermedad. En nuestro laboratorio habíamos obtenido previamente ratones dobles deficientes ($\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$) mediante cruzamientos durante 8 generaciones entre ratones deficientes en los genes apoE y ratones deficientes en la cadena- γ de los receptores de IgG⁶¹. Los ratones deficientes en el gen de la cadena- γ tienen un defecto funcional en todos sus receptores FcγR activadores (I, III y IV) debido a que esta cadena- γ asociada es necesaria tanto para la transducción de la señal como para la expresión y acoplamiento de los propios receptores¹¹⁵. Para analizar la contribución de los FcγR presentes en los monocitos/macrófagos generamos ratones quimera mediante trasplante de médula ósea de ratones dobles deficientes $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ a ratones apoE $^{-/-}$ que habían sido previamente irradiados para inducir aplasia de médula ósea (grupo γ apoE \rightarrow apoE). De esta forma, sólo las células con origen hematopoyético eran dobles deficientes en FcγR y apoE, mientras que el resto del animal mantenía la deficiencia simple en el gen apoE. En el grupo control se trasplantaron células de médula ósea de apoE $^{-/-}$ a otros ratones también apoE $^{-/-}$ e irradiados (grupo apoE \rightarrow apoE). Los animales trasplantados se alimentaron con dieta rica en grasa (21% grasa,

0.15% colesterol y 17.3% proteínas) durante 10 semanas para acelerar el proceso aterosclerótico que tiene lugar de forma espontánea por la deficiencia en apoE.

1.1. El trasplante de células de médula ósea de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ a ratones apoE $^{-/-}$ reduce la formación de lesiones ateroscleróticas.

En primer lugar se analizó la eficiencia del trasplante de médula ósea mediante PCR a partir de células sanguíneas de estos ratones (Figura 13A) y se pudo comprobar la alta efectividad en el cambio fenotípico que se había producido ($87 \pm 13\%$ de los animales). La supervivencia de los animales al trasplante fue muy elevada (% de supervivencia en la semana 4: apoE \rightarrow apoE, 85% y γ apoE \rightarrow apoE, 94%). Además, observando las curvas de supervivencia durante las 14 semanas del modelo, comprobamos que ambos grupos mantenían la misma tasa de mortalidad (Figura 13C). También se controlaron los niveles de colesterol y triglicéridos para ver si el trasplante o la deficiencia genética influían sobre estos parámetros, pero no observamos diferencias entre los dos grupos de estudio (Figura 13B).

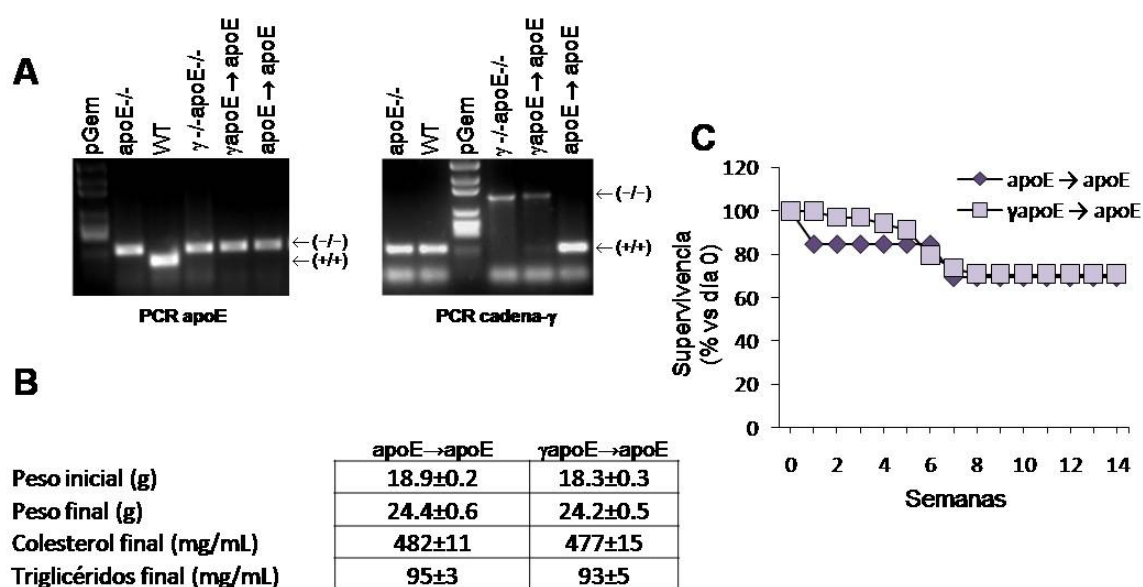


Figura 13: Eficiencia del trasplante de médula ósea y supervivencia de los ratones. Ratones macho deficientes para el gen apoE con fondo genético C57BL/6 se irradiaron y se trasplantaron con 1×10^7 células de médula ósea provenientes de ratones apoE $^{-/-}$ y dobles deficientes para la cadena- γ y apoE ($\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$) para la generación de quimeras apoE \rightarrow apoE ($n=17$) y γ apoE \rightarrow apoE ($n=22$). (A) La eficiencia del trasplante se analizó mediante PCR con cebadores de apoE y cadena- γ y el posterior análisis en geles. (B) Valores de peso, colesterol y triglicéridos de ambos grupos. (C) Curvas de supervivencia de los ratones trasplantados.

Tras el sacrificio, se extrajeron las aortas y se cortaron en secciones de 8 μ m hasta una longitud total de unas 960 μ m y mediante tinción con Oil-red-O/hematoxilina (Figura 14A) se analizó y cuantificó la lesión máxima de cada animal. Los ratones trasplantados γ apoE \rightarrow apoE

mostraron una reducción significativa ($59 \pm 3\%$ inhibición) en el tamaño de la lesión en comparación con el grupo control apoE→apoE (Figura 14B).

Además, en las tinciones con Oil-red-O/hematoxilina calculamos el tamaño medio de las células espumosas dividiendo el área con contenido lipídico por el número de núcleos celulares. El área ocupada por células espumosas en las lesiones de los ratones γ apoE→apoE era significativamente menor en comparación con los controles apoE→apoE ($66 \pm 8\%$ inhibición, Figura 14-C). Estos resultados sugieren que los receptores Fc γ R de las células derivadas de médula ósea son críticos en el desarrollo de la aterosclerosis en nuestro modelo animal.

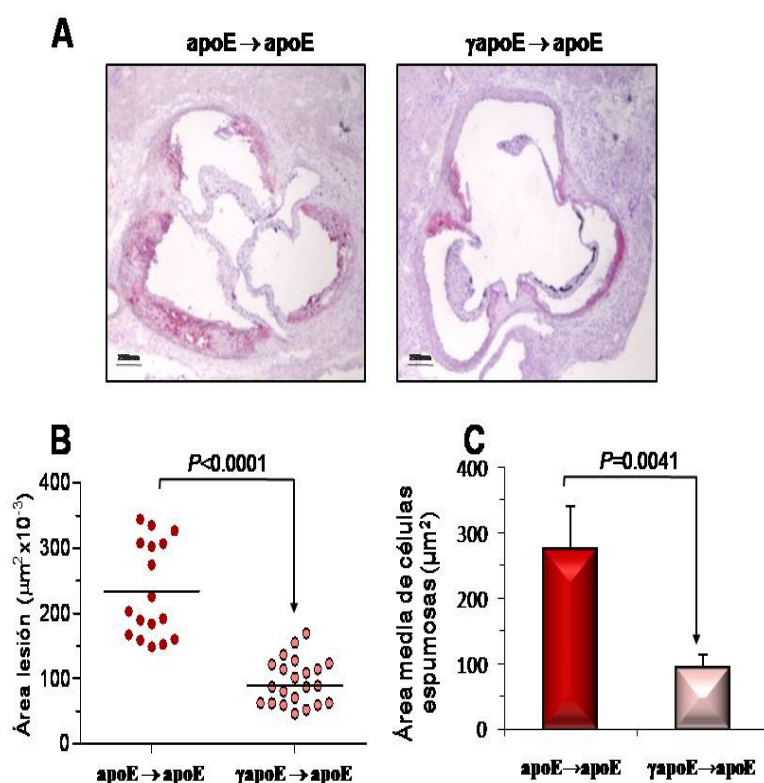


Figura 14: La deficiencia en Fc γ R de leucocitos reduce las lesiones ateroscleróticas y la formación de células espumosas. (A) Tinción con Oil-red-O contrastada con hematoxilina en secciones aórticas de ratones macho de los grupos apoE→apoE y γ apoE→apoE. Imágenes representativas; ampliación 40x. (B) Valores medios del área de la lesión en los dos grupos de estudio. (C) Superficie de placa ocupada por células espumosas medida en la tinción Oil-red-O y expresada en μm^2 . Los resultados están expresados como media \pm error estándar. La significación estadística respecto del grupo control se indica en cada gráfica.

1.2. La deficiencia en la cadena- γ de leucocitos disminuye su acumulación en la lesión aterosclerótica.

Se ha sugerido que el reclutamiento de células del sistema inmune innato puede ser un factor positivo en los primeros estadios de la enfermedad aterosclerótica, ya que son las encargadas de la eliminación de LDL modificadas y de posibles restos celulares originados en las zonas sensibles del vaso⁵⁴. Sin embargo, el avance del proceso inflamatorio y el excesivo reclutamiento de monocitos a las zonas de lesión termina produciendo una liberación descontrolada de mediadores inflamatorios y un acúmulo excesivo de células espumosas cargadas

de LDL. De hecho, la mayor presencia de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas se relaciona con una mayor inflamación y peor pronóstico de las mismas. En este modelo quisimos estudiar si los macrófagos deficientes en los FcγR eran capaces de ser reclutados al lugar de la lesión. Para ello, realizamos una tinción inmunohistoquímica con el marcador de monocitos/macrófagos MOMA-2 en cortes adyacentes a los de la lesión máxima. Los resultados mostraron que las lesiones de los ratones $\gamma\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ contenían la mitad de los macrófagos infiltrantes que los del grupo control $\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ ($50 \pm 5\%$ inhibición, Figura 15A y 15B). A continuación estudiamos la correlación entre el contenido de macrófagos y el tamaño de la lesión de cada ratón y observamos que las mayores lesiones contenían mayor acúmulo de macrófagos, tal y como se ha descrito anteriormente⁸⁷ (Figura 15C).

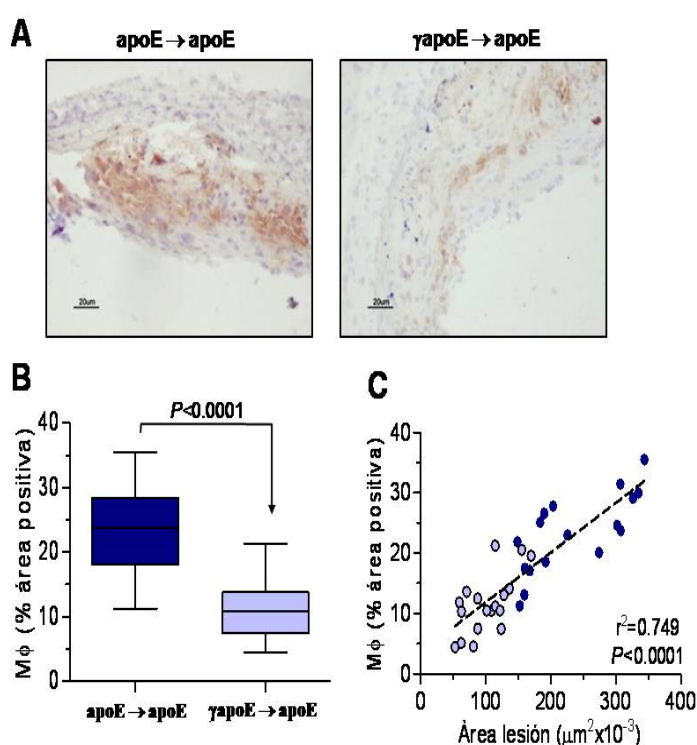


Figura 15: La deficiencia en FcγR reduce el infiltrado de macrófagos en ratones $\text{apoE}^{-/-}$. Análisis histológico de macrófagos (MΦ, marcados con MOMA-2) en las lesiones aórticas. (A) Fotografías representativas de secciones aórticas de ratones de los grupos $\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ y $\gamma\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ (ampliación x200). (B) Cuantificación de la tinción positiva para MOMA-2 en las lesiones. Los resultados están expresados como diagramas de cajas. (C) Análisis de regresión de la tinción de MOMA-2 vs área de lesión en placas de ratones $\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ (●) y $\gamma\text{apoE} \rightarrow \text{apoE}$ (○). La significación estadística y el coeficiente de correlación (r^2) se indican en cada gráfica.

El papel de los linfocitos T y su actividad amplificadora de la respuesta inmune adaptativa han sido ampliamente estudiados en la aterosclerosis y otras enfermedades¹⁶⁶. Los linfocitos T liberan citoquinas pro-inflamatorias en las lesiones y además inducen la actividad sistémica de los linfocitos B, con el consiguiente aumento en la síntesis de anticuerpos. La unión de estos Ac con sus respectivos Ag, por ejemplo LDL, genera la formación de IC que, al interaccionar con sus receptores específicos (FcγR en el caso de IgG) activan la respuesta inflamatoria de células residentes e infiltrantes. En nuestro modelo animal estudiamos el contenido de linfocitos T en las lesiones mediante tinción con el marcador CD4. El grupo de

animales γ apoE \rightarrow apoE presentó una gran disminución de estos linfocitos T en comparación con los controles apoE \rightarrow apoE (% inhibición vs control: 68 ± 3 , Figura 16A y 16B). Además, de forma similar a lo observado en el contenido de macrófagos, el análisis de regresión (CD4 vs área de lesión) mostró una relación directa entre ambas variables (Figura 16C).

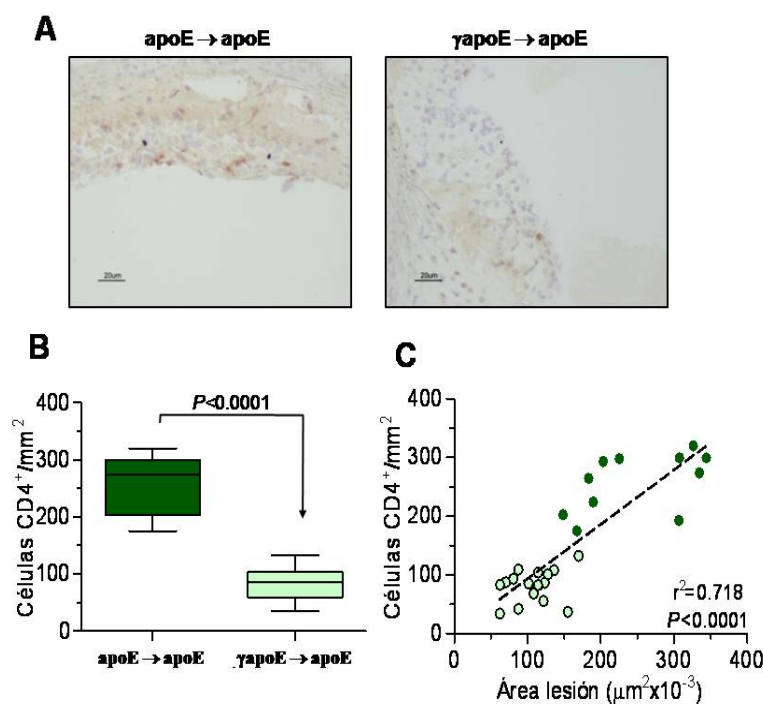


Figura 16: Disminución en el infiltrado de linfocitos T CD4⁺ en aortas de ratones trasplantados con células deficientes en FcγR. (A) Fotografías representativas de la tinción con CD4 en secciones aórticas de los ratones de los grupos indicados (ampliación x200). (B) Cuantificación de la tinción positiva para CD4 en el área de la lesión. (C) Análisis de regresión de la tinción de CD4 vs área de lesión en placas de ratones apoE \rightarrow apoE (●) y γ apoE \rightarrow apoE (○). La significación estadística y el coeficiente de correlación (r^2) se indican en cada gráfica.

1.3. El trasplante de médula de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ reduce la inflamación en el arco aórtico de los ratones apoE $^{-/-}$.

Los mediadores inflamatorios liberados por las células residentes e infiltrantes son los que “dirigen” el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Tanto su composición como su concentración pueden, por un lado, influir en la resolución de la inflamación y de la lesión; por otro lado, pueden mantener un proceso inflamatorio prolongado que cause la sobreacumulación de células infiltrantes y el aumento del tamaño de la lesión e incluso que finalice en estenosis o ruptura de la placa y formación de trombos.

La expresión génica de los mediadores inflamatorios está estrechamente regulada a nivel transcripcional. Entre los diferentes factores de transcripción implicados, destaca el NF-κB como principal mecanismo regulador de la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en las lesiones ateroscleróticas. Quisimos confirmar si la reducción en el tamaño de la lesión y el contenido leucocitario en aortas de ratones deficientes en FcγR era debida a una menor

expresión de mediadores inflamatorios. Para ello, en primer lugar analizamos la activación de NF- κ B en cortes de aorta cercanos al máximo de la lesión mediante inmunohistoquímica Southwestern, que produce una tinción nuclear violeta en aquellas células con NF- κ B activado. Los ratones trasplantados γ apoE \rightarrow apoE presentaron una reducción significativa en la activación de NF- κ B en comparación con los controles apoE \rightarrow apoE (% inhibición vs control: 63 ± 5 , Figura 17A y 17B). Además, encontramos una fuerte asociación positiva entre la actividad NF- κ B y el tamaño de la lesión en nuestro modelo experimental (Figura 17C).

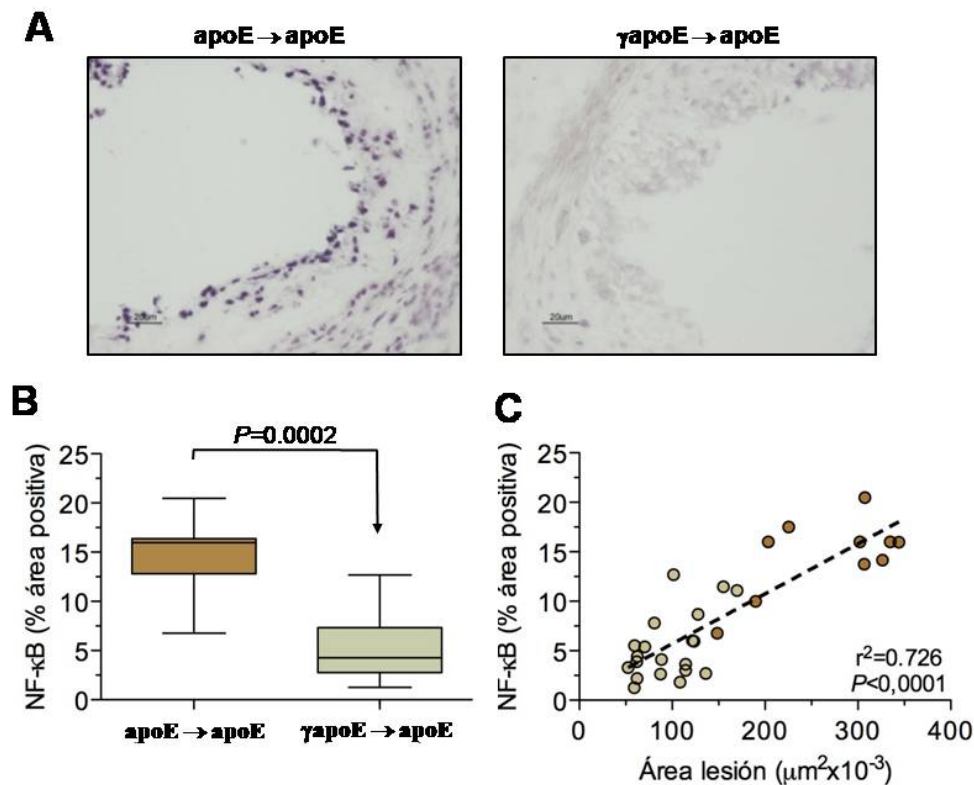


Figura 17: La activación del factor de transcripción NF- κ B disminuye en los ratones trasplantados con células deficientes en Fc γ R. Localización *in situ* de la activación de NF- κ B analizada por Southwestern. (A) Fotografías representativas de la activación de NF- κ B en secciones de aorta de ratones (ampliación x200). (B) Cuantificación de las células con tinción positiva para NF- κ B. Los resultados están expresados como diagramas de cajas. (C) Análisis de regresión de la tinción de NF- κ B vs área de lesión en placas de ratones apoE \rightarrow apoE (●) y γ apoE \rightarrow apoE (○). La significación estadística y el coeficiente de correlación (r^2) se indican en cada gráfica.

A continuación estudiamos en las placas ateroscleróticas de estos ratones la expresión *in situ* de CCL2, una de las principales quimioquinas atrayentes de monocitos. Mediante tinción de este factor observamos que el grupo trasplantado con células deficientes en Fc γ R presentaba una reducción significativa de la expresión de CCL2 en comparación con el grupo control (% inhibición: 73 ± 6 , Figura 18A y 18B). Al igual que con las anteriores variables, encontramos una correlación directa entre la expresión local de CCL2 y el tamaño de las lesiones (Figura 18C).

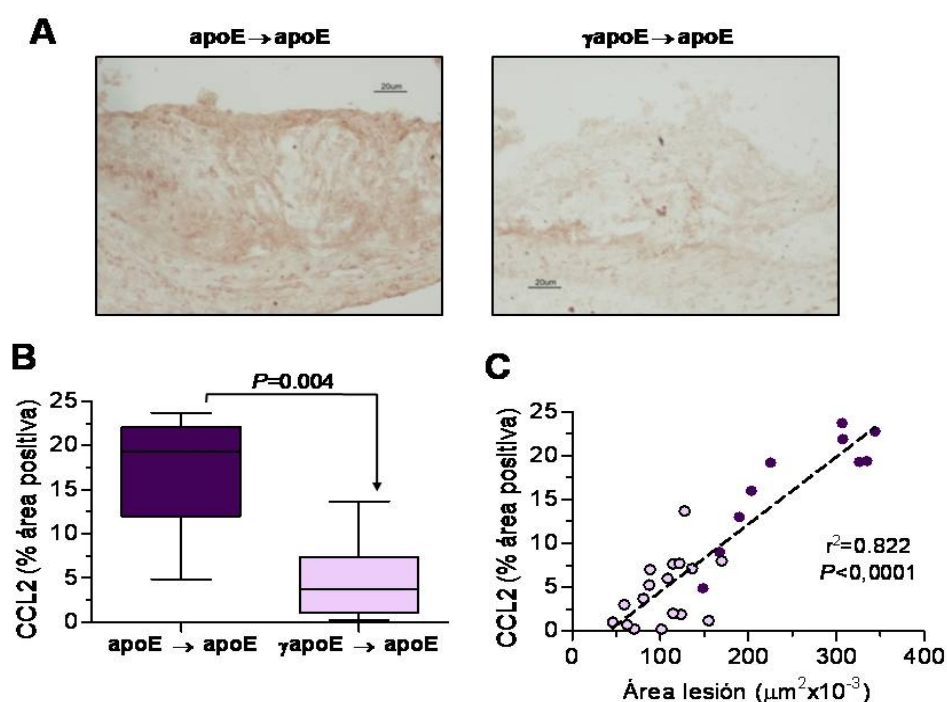


Figura 18: Las aortas de ratones trasplantados con células deficientes en FcγR muestran menor expresión de la quimioquina CCL2. (A) Fotografías de secciones de aortas con tinción para la quimioquina de monocitos CCL2. Los ratones trasplantados apoE→apoE muestran mayor tinción de CCL2 que los trasplantados γapoE→apoE (ampliación x200). (B) Cuantificación de la tinción de CCL2. Los resultados están expresados como diagramas de cajas. (C) Análisis de regresión de la tinción de CCL2 vs área de lesión en placas de ratones apoE→apoE (●) y γapoE→apoE (○). La significación estadística y el coeficiente de correlación (r^2) se indican en cada gráfica.

Finalmente, mediante PCR a tiempo real estudiamos la expresión génica de tres mediadores inflamatorios regulados por el factor nuclear-κB: la molécula de adhesión implicada en la unión entre monocitos y células endoteliales, ICAM-1; la propia quimioquina CCL2; y la principal citoquina pro-inflamatoria TNF-α. Como se puede apreciar en la figura 19, la expresión de los tres genes se inhibió significativamente en el grupo γapoE→apoE en comparación con los controles apoE→apoE (% de inhibición vs control: ICAM-1, 44±8; CCL2, 55±3; TNF-α, 55±7).

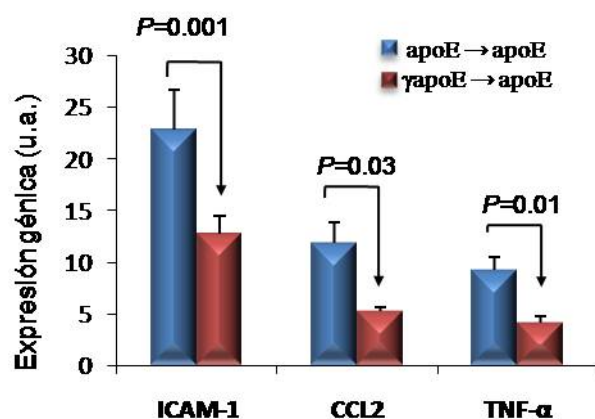


Figura 19: Efecto de la deficiencia en FcγR en la expresión de genes dependientes de NF-κB. La expresión de ICAM-1, CCL2 y TNF-α en RNA extraído de aorta (segmento toraco-abdominal) de ratones apoE→apoE y γapoE→apoE, se analizó mediante PCR a tiempo real. Los valores se normalizaron con el gen endógeno 18S y se expresan en unidades arbitrarias (u.a.).

1.4. Distribución de inmunoglobulinas en el suero de los ratones ateroscleróticos.

Estudios previos han sugerido que la hipercolesterolemia genera una respuesta inmune humoral caracterizada por la síntesis de Ac frente a diferentes auto-Ag, principalmente LDLox⁵⁴. De hecho, en el suero de pacientes y animales ateroscleróticos se ha encontrado una producción aumentada de estos niveles de Ac, principalmente de los isotipos IgM e IgG^{22, 163}. Nosotros analizamos en el modelo experimental la producción de Ig totales y específicas de LDLox en suero mediante ELISA. Los niveles totales de IgG e IgM no variaron entre los dos grupos de estudio (Figura 20A). Tampoco detectamos diferencias significativas en los subtipos de IgG (IgG₁, IgG_{2a/c}, IgG₃; Figura 20B). Sorprendentemente, los niveles de IgG específicos anti-LDLox y sus subclases aumentaron en el grupo γ apoE→apoE (Figura 20-C,-D). Sin embargo, la relación entre IgG_{2a/c} (respuesta Th1) e IgG₁ (respuesta Th2) no varió entre ambos grupos (1.25 ± 0.07 vs 1.33 ± 0.15 ; $P > 0.05$) lo que descarta un cambio en la tendencia Th1/Th2 como responsable de la disminución de las lesiones en los ratones deficientes en Fc γ R.

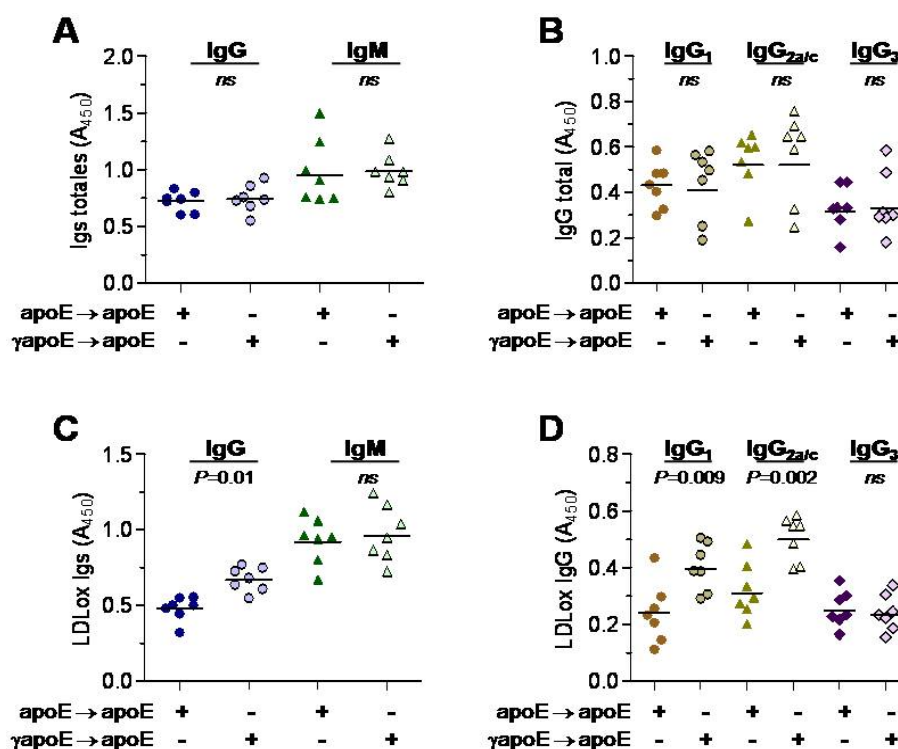


Figura 20: Distribución de isotipos de inmunoglobulinas en los ratones trasplantados. Los niveles de inmunoglobulinas totales (A, B) y específicas de LDLox (C, D) se midieron en el suero de los ratones apoE→apoE y γ apoE→apoE mediante ELISA. Los datos se expresaron en unidades de absorbancia a $\lambda=450\text{nm}$. Cada símbolo representa un animal; las barras horizontales representan los valores medios. La significación se indica en cada figura (n.s., no significativo).

1.5. El trasplante de médula ósea de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ promueve el fenotipo M2 en los macrófagos de la lesión y sistémicos.

Además de observar una reducción la cantidad absoluta de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas de ratones trasplantados γ apoE \rightarrow apoE, quisimos caracterizar también su fenotipo. Para ello, estudiamos la expresión de las isoformas de arginasa (Arg2 y Arg1) como marcadores fenotípicos que distinguen los macrófagos pro-inflamatorios clásicos M1 (Arg2), de los de activación alternativa anti-inflamatoria M2 (Arg1). Mediante inmunofluorescencia con Ac para estos marcadores M1 y M2, observamos la presencia de ambos fenotipos en las lesiones ateroscleróticas de nuestro modelo animal, aunque en proporciones diferentes. Así, mientras que los macrófagos M1(Arg2) eran el tipo más abundante en los ratones apoE \rightarrow apoE, el grupo γ apoE \rightarrow apoE se caracterizó por una predominancia del tipo M2 (Arg1, Figura 21A y 21B). La expresión génica en tejido aórtico de los animales confirmó la mayor expresión de Arg1 en los ratones γ apoE \rightarrow apoE (Figura 21C). Además, el cálculo de la relación M1/M2 (promedio por grupo: apoE \rightarrow apoE, 2.35 ± 0.15 ; γ apoE \rightarrow apoE, 0.43 ± 0.04 , $P < 0.0001$) y su posterior análisis de regresión (Figura 21D) demostraron que el mayor tamaño de la lesión se correlacionaba con un predominio de los macrófagos con fenotipo M1 respecto a los de fenotipo M2.

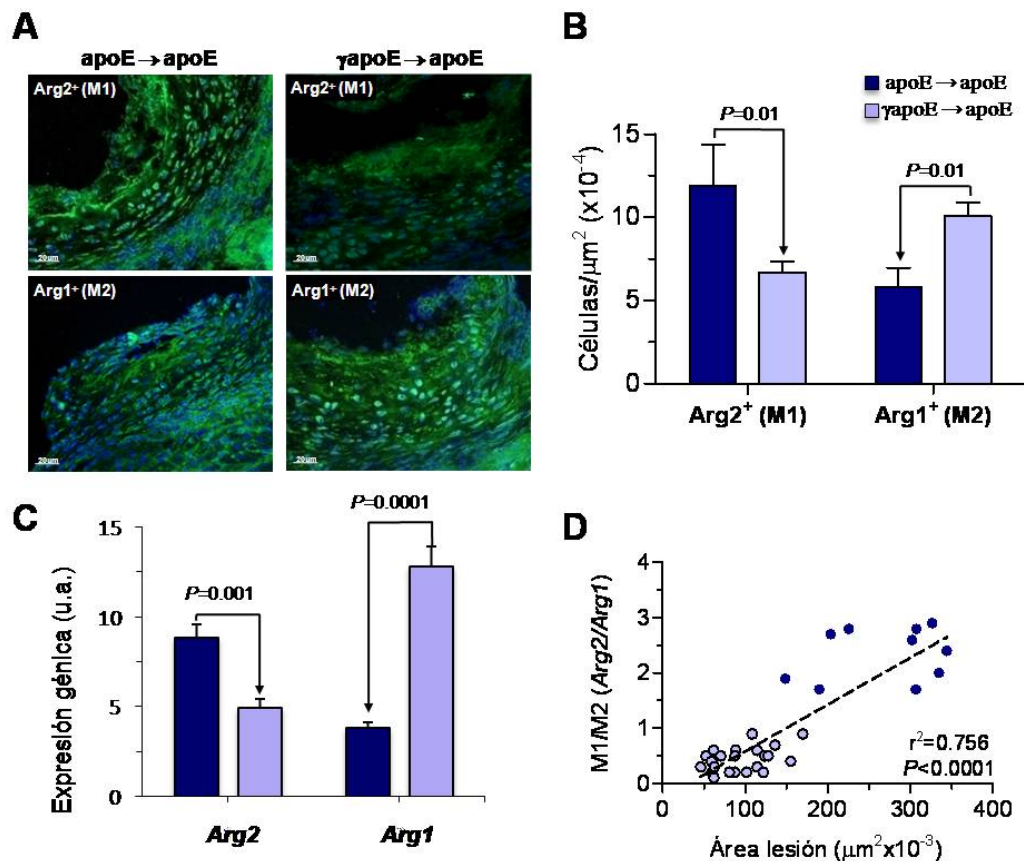


Figura 21: Efecto de la deficiencia en FcγR en el fenotipo de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas (ampliación x200) de las inmunofluorescencias de Arg2 y Arg1 en secciones consecutivas de aorta de ratones trasplantados. (B) Cuantificación de células positivas Arg2⁺(M1) y Arg1⁺(M2) en el área de la lesión. Los resultados se representan como media ± error estándar. (C) Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión génica de Arg2 y Arg1 en tejido aórtico. (D) Análisis de regresión de la ratio M1/M2 vs el área de lesión en ratones apoE → apoE (●) y γapoE → apoE (○).

Para determinar si la deficiencia en FcγR tenía efectos sistémicos sobre el fenotipo de los macrófagos, realizamos estudios en macrófagos peritoneales extraídos mediante lavado peritoneal de ratones salvajes (WT), apoE^{-/-} y γ^{-/-}apoE^{-/-}. La acumulación lipídica y la formación de células espumosas en los macrófagos peritoneales se determinó por tinción Oil-red-O/hematoxilina. Observamos un menor número de células espumosas (con 4 o más gotas lipídicas en su interior) en los ratones doble deficientes γ^{-/-}apoE^{-/-} en comparación con los apoE^{-/-} (Figura 22A). A continuación se evaluó la expresión de mRNA (Figura 22C) y proteína (Figura 22B) de los marcadores Arg2 y Arg1. Observamos una mayor expresión de Arg2 (marcador M1) en los macrófagos peritoneales de ratones apoE^{-/-} en comparación con los WT, así como un cambio a

mayor abundancia del marcador M2 (Arg1) en las células de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$. Estos resultados indican que la ausencia de receptores activadores Fc γ R en los ratones ateroscleróticos reduce la cantidad de macrófagos pro-inflamatorios M1 y aumenta los anti-inflamatorios M2.

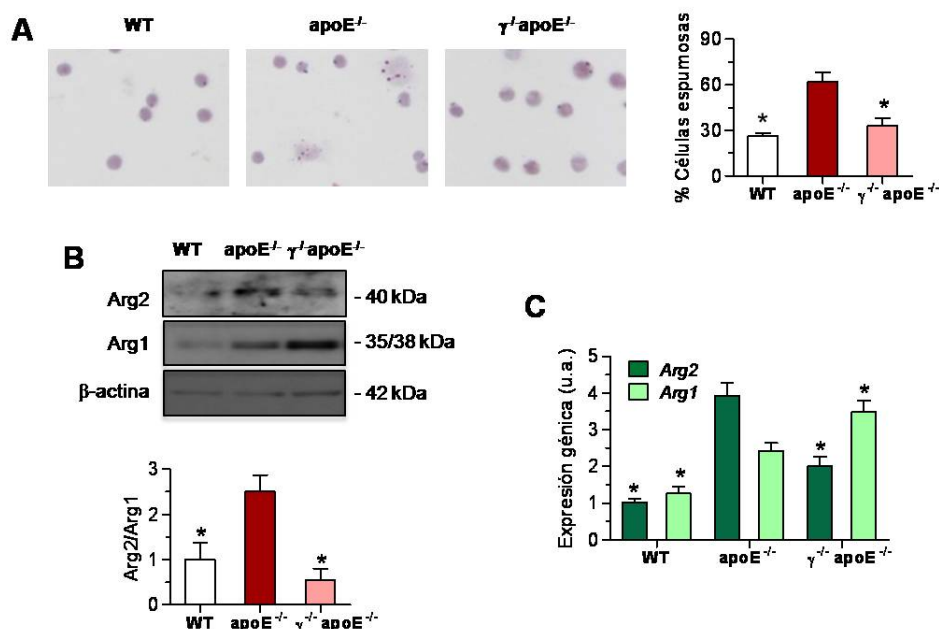


Figura 22: Efectos sistémicos de la deficiencia en Fc γ R en los macrófagos peritoneales. (A) Acumulación de lípidos teñidos con Oil-red-O en macrófagos peritoneales extraídos de ratones salvajes (WT), apoE $^{-/-}$ y $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$. Fotografías representativas y cuantificación del número de células espumosas (% de macrófagos peritoneales con 4 o más gotas lipídicas). (B) Análisis de la expresión proteica de Arg2 y Arg1 mediante Western blot. Membranas representativas y resumen de los datos de densitometrado, corregidos por el control de carga (β -actina). (C) Expresión génica de Arg2 y Arg1 analizada mediante PCR a tiempo real. Los valores presentados son media \pm error estándar de n=4-6 animales por grupo (*, $P < 0.05$ vs apoE $^{-/-}$).

2. Estudios *in vitro*: macrófagos derivados de médula ósea.

Para profundizar en los efectos de la deficiencia de los receptores Fc γ R sobre el fenotipo y funcionamiento de los macrófagos, realizamos estudios *in vitro* en células derivadas de médula ósea. Se extrajeron células de médula ósea de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ y de sus controles apoE $^{-/-}$ y se diferenciaron a macrófagos durante 7 días en presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF)⁷⁶. Para imitar las acciones *in vivo* de los IC de IgG, se utilizó el modelo bien establecido de estimulación celular con agregados solubles de IgG (75 μ g/mL)^{61, 74}. La estimulación de los macrófagos procedentes de ratones apoE $^{-/-}$ con agregados de IgG indujo un incremento en la expresión relativa Arg2/Arg1, indicativo de la polarización M1. Sin embargo, esta tendencia a fenotipo pro-inflamatorio se redujo significativamente en células de ratones $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ (% disminución vs apoE $^{-/-}$: 64 \pm 10, Figura 23A).

A continuación analizamos la expresión de mediadores clásicos asociados a este fenotipo pro-inflamatorio, como las quimioquinas CCL2 y CCL5 y las citoquinas TNF- α e IL-6. En macrófagos apoE^{-/-} observamos un aumento significativo en los niveles de mRNA de los cuatro genes citados tras la estimulación con agregados de IgG. Por el contrario, dicha expresión se inhibió drásticamente en macrófagos procedentes de ratones γ ^{-/-}apoE^{-/-} (% disminución vs apoE^{-/-}: CCL2, 58 \pm 8; CCL5, 58 \pm 6; TNF- α , 48 \pm 5; IL-6, 56 \pm 6; P <0.05, Figura 23B). Resultados similares se observaron en la secreción de la quimioquina CCL2 (% disminución vs apoE^{-/-}: 27 \pm 9, P <0.05, Figura 23C).

El estrés oxidativo, definido como una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno que sobrepasa los mecanismos antioxidantes de la célula, juega un papel importante en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. En pacientes ateroscleróticos y modelos animales, la producción aumentada de especies reactivas de oxígeno se asocia con vasoconstricción, disfunción endotelial, migración y crecimiento de células y modificación de proteínas de matriz extracelular. La generación de radicales libres de oxígeno a nivel vascular se produce principalmente por activación de NADPH oxidasa y disfunción mitocondrial. La expresión y actividad de NADPH oxidasa se ha descrito en células endoteliales, vasculares y monocitos/macrófagos de las lesiones y está regulada por citoquinas, lípidos y hormonas. En nuestros experimentos determinamos la actividad NADPH oxidasa en macrófagos mediante ensayo de quimioluminiscencia con lucigenina. El complejo enzimático NADPH oxidasa utiliza como sustrato donador de electrones NADPH reducido para generar O₂⁻, lo que se acompaña de una emisión débil de luz. En estos experimentos, la amplificación de la quimioluminiscencia se produce por la presencia en el medio del compuesto lucigenina, capaz de oxidarse por los radicales libres O₂⁻ generados y emitir fotones con mayor rendimiento cuántico, lo que permite su detección y medida en un luminómetro. Mediante esta técnica de la lucigenina, Pudimos observar que en los macrófagos apoE^{-/-} la estimulación con agregados de IgG aumentaba significativamente la producción del anión superóxido y que dicha respuesta oxidativa se atenuaba en los macrófagos γ ^{-/-}apoE^{-/-} (% disminución vs apoE^{-/-}: 43 \pm 5, P <0.05, Figura 23D).

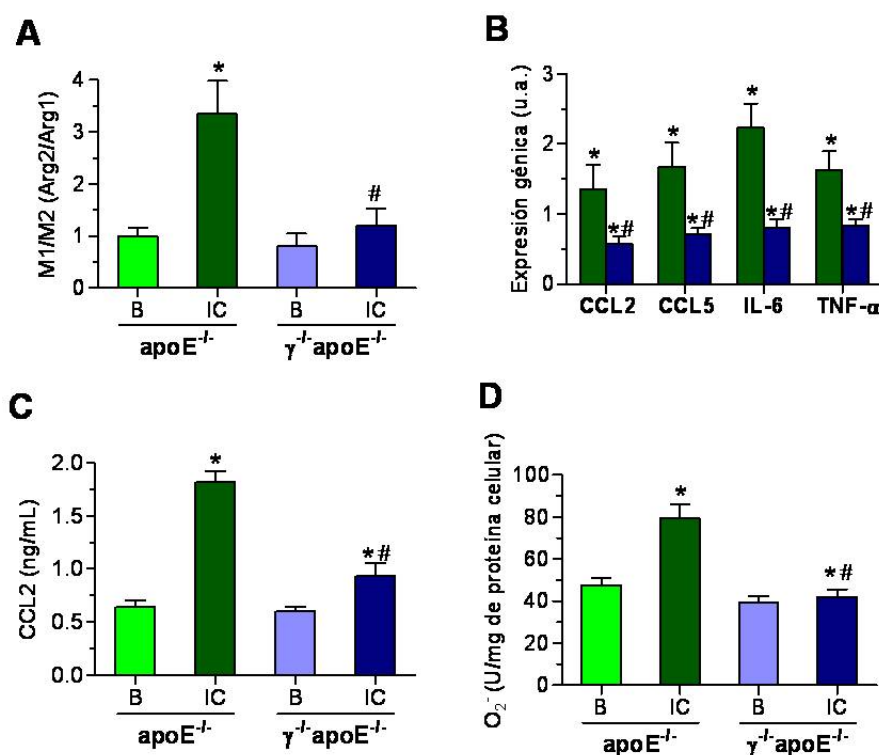


Figura 23: Respuestas de los macrófagos derivados de médula ósea a la estimulación de sus FcγR. Macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones apoE^{-/-} y γ^{-/-}apoE^{-/-} se estimularon con agregados de IgG (75μg/mL). (A) Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de Arg2 y Arg1 a 3 horas de estimulación. Los valores normalizados con el control endógeno 18S se representan como proporción relativa. (B) Análisis de expresión génica de los genes inflamatorios expresados en unidades arbitrarias (u.a.). (C) Medida por ELISA de la concentración de CCL2 en sobrenadantes de macrófagos estimulados durante 3 horas. (D) Determinación de la producción de anión superóxido a 1 hora de estimulación mediante ensayo de quimioluminiscencia con lucigenina, expresando los valores en unidades por miligramo de proteína. Los datos representan la media ±error estándar de 4-8 experimentos independientes. (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs apoE^{-/-}).

PARTE II: MODULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL

La aterosclerosis es considerada como una enfermedad inmunoinflamatoria del vaso donde la inflamación mal regulada es uno de los principales factores desencadenantes. Esta inflamación es originada por mediadores que se producen tanto en células infiltrantes como en células residentes del vaso. La expresión génica de los mediadores pro-inflamatorios está estrechamente controlada por factores de transcripción, entre los que destaca el factor nuclear- κ B (NF- κ B). La activación de la vía NF- κ B ha sido descrita tanto en lesiones de pacientes y animales ateroscleróticos como en células aisladas *in vitro*⁷.

La señalización de la vía clásica de NF- κ B se produce mediante la activación de las quinasas que controlan la fosforilación de la subunidad reguladora I κ B. Este proceso libera el dímero NF- κ B compuesto por las proteínas p65 y p50, que se transloca al núcleo uniéndose a las secuencias de sus genes diana. Existen estudios donde se demuestra que la inhibición de NF- κ B resulta beneficiosa en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias¹³⁴, incluyendo la aterosclerosis⁹⁶. La mayoría de estos estudios se centran en la inhibición de las vías de activación de NF- κ B, pero no existen trabajos que incidan en la inhibición de la translocación nuclear de dicho factor. En esta segunda parte de la tesis quisimos estudiar las consecuencias funcionales de la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B sobre las respuestas inflamatorias asociadas al desarrollo de la aterosclerosis.

Diseñamos para ello un pequeño péptido sintético y permeable que contiene la señal de localización nuclear (SLN) de la proteína p50⁹⁰ y que es capaz de inhibir la activación de NF- κ B de forma específica sin efectos adversos sobre la viabilidad celular. Como control estructural se ha utilizado el péptido M-SLN cuya secuencia de localización nuclear ha sido mutada eliminando así su función inhibitoria. Los efectos *in vitro* del péptido SLN se analizaron de forma paralela en 2 tipos diferentes de células murinas implicadas en la formación de la placa ateromatosa, las células de músculo liso vascular (CMLV) y la macrófagos (línea celular RAW 264.7). Tras comprobar *in vitro* la capacidad anti-inflamatoria del péptido, se estudió si el tratamiento influía sobre la formación de la lesión en un modelo de aterosclerosis acelerada por dieta rica en grasa en ratones deficientes para el gen apoE.

1. Acciones *in vitro* del péptido inhibidor SLN.

Las células de ratón (CMLV y macrófagos) se deplecionaron durante 12h con medio sin suero y se pretrataron durante 90 mins con diferentes concentraciones molares de péptido SLN o

su control negativo M-SLN. A continuación se incubaron durante 30 min con un potente estímulo inflamatorio, el lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1µg/mL).

La actividad NF-κB se determinó por su capacidad de unión al DNA (secuencia consenso κB) mediante EMSA a partir de extractos nucleares. De esta forma, comprobamos que el LPS indujo un incremento en la activación de NF-κB en macrófagos con respecto a las condiciones basales. Este efecto se inhibió de forma dosis-dependiente por el péptido SLN, pero no en presencia del control estructural (M-SLN) (Figura 24A). Resultados similares se obtuvieron en CMLV (Figura 24B).

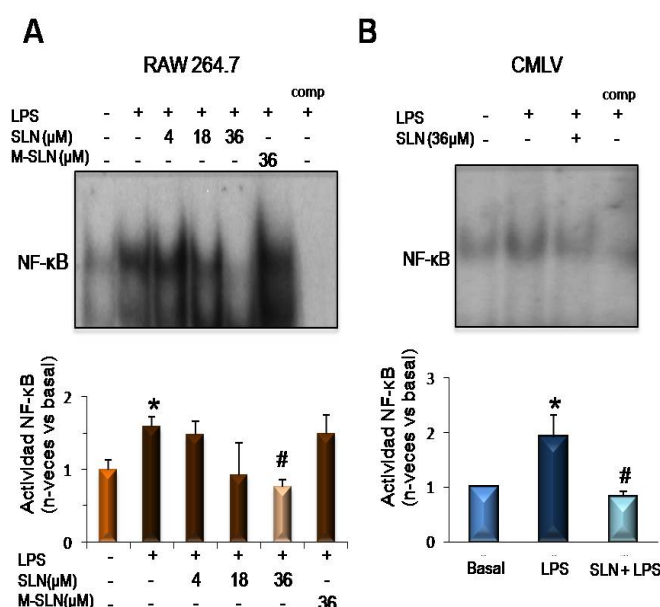


Figura 24: El péptido SLN inhibe la activación de NF-κB *in vitro*. Se preincubaron células RAW 264.7 (A) y CMLV (B) de ratón con las concentraciones indicadas de péptido SLN y su control estructural (M-SLN) durante 90 min antes de estimularlas con LPS y la actividad se analizó por EMSA. La especificidad de la unión se comprobó por competición (comp) con un exceso de 100-veces de oligonucleótido no marcado. El resumen del análisis densitométrico de las bandas se indica debajo. Los resultados se muestran como media ± error estándar de 3-5 experimentos independientes (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS).

Para corroborar estos datos, se analizó mediante Western blot la presencia de la proteína p65 (parte constituyente del dímero clásico de NF-κB) en extractos nucleares de CMLV y macrófagos. La estimulación con LPS aumentó los niveles nucleares de p65 en ambos tipos celulares y este efecto se previno en presencia del péptido SLN (Figura 25A y 25B). Finalmente detectamos mediante inmunofluorescencia la localización nuclear de p65 en CMLV. Como se puede observar en la figura 25C, la estimulación con LPS concentró la mayor parte del p65 en el núcleo celular y este efecto fue inhibido por tratamiento con el péptido SLN.

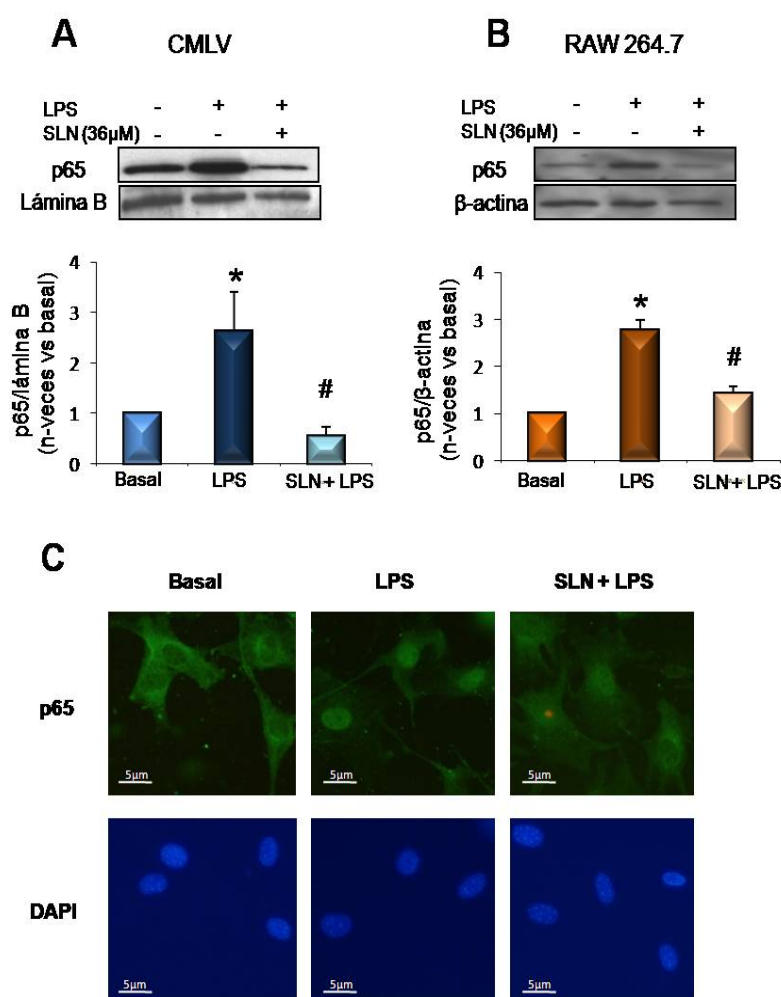


Figura 25: El péptido SLN inhibe la translocación nuclear de p65. Se preincubaron CMLV y RAW 264.7 con péptido SLN durante 90 min antes de su estimulación con LPS. (A, B) Análisis mediante Western blot de extractos nucleares con Ac de p65 empleando lámina B y β-actina como control de carga. Imágenes representativas de 3-5 experimentos. Los datos del análisis de bandas se expresan como n-veces vs basal (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS). (C) La distribución subcelular de p65 en CMLV se comprobó mediante inmunofluorescencia. Ampliación x200. Se observa p65 en verde y los núcleos celulares (tinción con DAPI) en azul.

1.1. Efecto del péptido SLN sobre la viabilidad y la proliferación celular.

Para descartar posibles efectos nocivos del péptido SLN sobre la viabilidad celular, se realizaron experimentos de proliferación (medio con 10% de SFB, 24h) en presencia del péptido durante todo el tiempo de estudio. La proliferación de CMLV (ensayo de azul de metileno) no se vio afectada por ninguna de las concentraciones de péptidos SLN utilizadas (4-36μM, Figura 26A). De forma similar, la viabilidad celular de la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 (ensayo MTT) estimulados con LPS durante 15h no se modificó por la presencia del péptido SLN (Figura 26B).

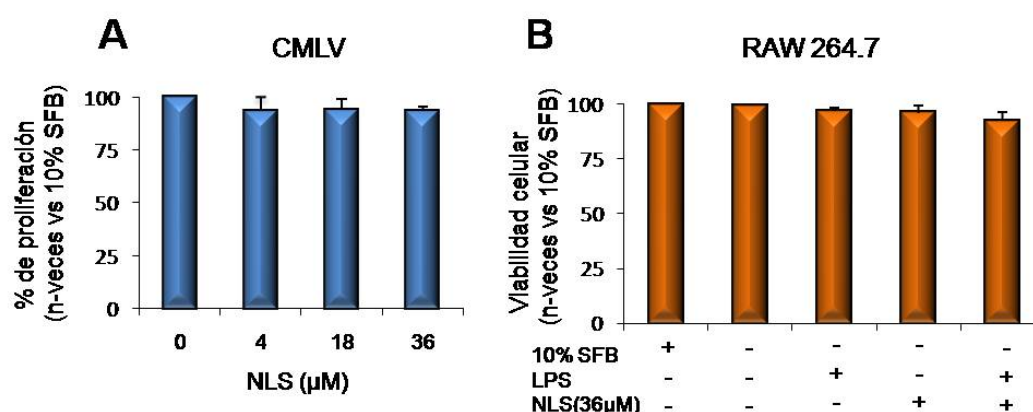


Figura 26: Análisis de proliferaci3n y viabilidad celular en presencia del péptido SLN. (A) Se estudió el efecto de varias concentraciones de péptido sobre la proliferaci3n de CMLV medida a 24h mediante azul de metileno. (B) La viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 a 15h de estimulaci3n se midi3 por tinci3n MTT. No se observaron diferencias significativas en ambos ensayos ($P > 0.05$ vs 10% SFB).

1.2. Modulaci3n de la expresi3n de genes dependientes de NF-κB por el péptido SLN.

El factor de transcripci3n NF-κB controla la expresi3n g3nica de numerosos genes pro-inflamatorios con funciones importantes en la aterog3nesis. Entre ellos, estudiamos el efecto del péptido SLN en la expresi3n g3nica de la mol3cula de adhesi3n celular ICAM-1¹¹⁰, de quimioquinas de monocitos/macrófagos (CCL2) y de linfocitos T (CCL5), as3 como de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α. Tanto en CMLV (Figura 27A) como en macrófagos RAW264.7 (Figura 27B), la estimulaci3n durante 3h con LPS indujo una sobre-expresi3n de los cuatro genes estudiados que se vio casi completamente inhibida por el pretratamiento durante 90 min con el péptido SLN. Adem3s de este resultado, realizamos una curva de dosis respuesta de inhibici3n de dos de estos genes inflamatorios (TNF-α y CCL5, Figura 27C). El péptido mostr3 una inhibici3n m3xima cercana al 90% a partir de 45μM y una IC50 alrededor de 30μM, lo que confirma la idoneidad de la dosis empleada en la mayor3a de los estudios de inhibici3n *in vitro* (36μM). Finalmente analizamos mediante ELISA la secreci3n de la quimioquina CCL2 al medio extracelular en los sobrenadantes de CMLV. Pudimos observar que la secreci3n de CCL2 inducida por LPS se redujo en aproximadamente un 70% en presencia del péptido SLN (Figura 27D).

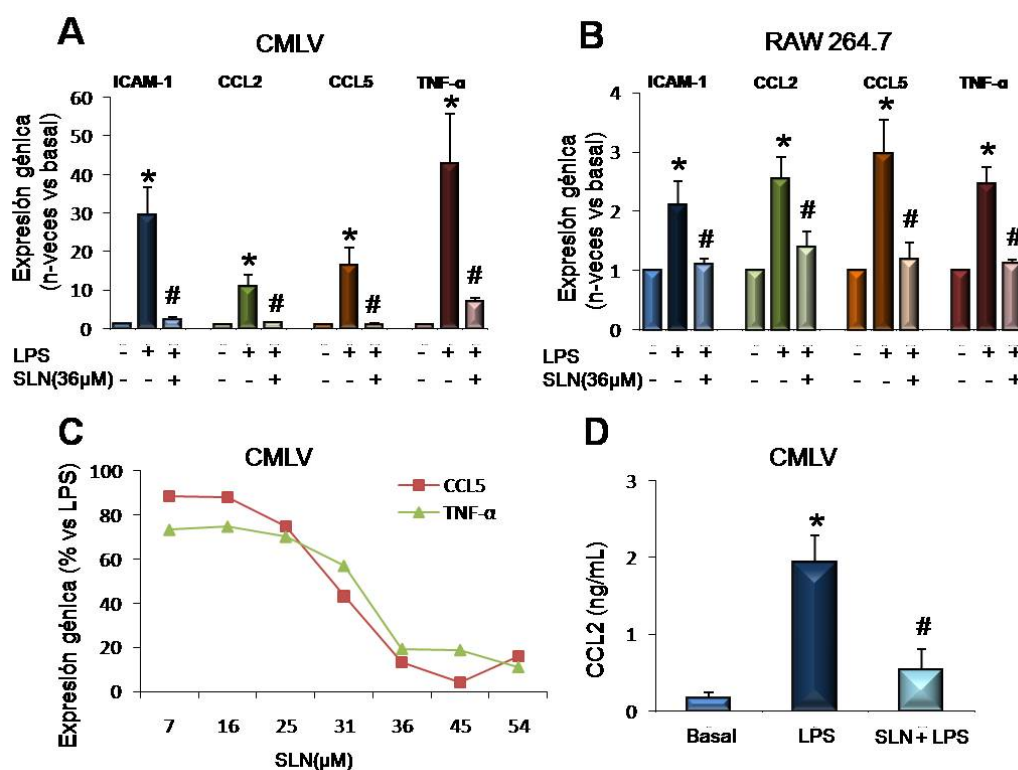


Figura 27: Efectos anti-inflamatorios *in vitro* del péptido SLN. Análisis de la expresión génica de genes inflamatorios mediante PCR cuantitativa a tiempo real en CMLV (A) y macrófagos (B) preincubados con péptido SLN antes de la estimulación con LPS durante 3h. Los valores normalizados por la expresión endógena del gen 18S se representan como n-veces vs basal (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS). (C) Efecto de concentraciones crecientes del péptido SLN en la expresión génica de CCL5 y TNF- α en las CMLV estimuladas con LPS. Curvas representativas de experimentos duplicados. (D) Medida por ELISA de la liberación al medio extracelular de la quimioquina CCL2 (ng/mL). Los resultados se indican como media \pm error estándar de 3-6 experimentos (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS).

1.3. El péptido SLN bloquea el transporte nuclear del NF- κ B activado.

Los datos anteriormente mostrados indicaron que el péptido SLN es capaz de reducir la presencia en el núcleo del factor NF- κ B activado y su posterior actividad transcripcional. A continuación quisimos caracterizar los componentes del sistema de translocación nuclear inhibidos por el péptido SLN. Estudios previos han descrito que las proteínas p65 y p50 que componen el dímero clásico de NF- κ B son transportadas al núcleo celular mediante las proteínas denominadas importinas³⁵. Existen seis importinas α ($\alpha 1$, $\alpha 3$ - $\alpha 7$) en humano y ratón que tienen diferentes afinidades según el tejido y la proteína que se transporta. Para identificar las importinas implicadas en nuestro estudio, se realizaron ensayos *pull-down* de unión proteína-proteína *in vitro* entre p65 e importinas. Para ello, utilizamos distintas isoformas de importinas unidas a GST que se sobre-expresaron en bacterias, se purificaron y se unieron a bolas de glutation sefarosa. Los extractos nucleares de CMLV pretratadas con el péptido SLN y estimuladas con LPS se incubaron

con las importinas $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ y las proteínas retenidas se analizaron mediante Western blot con Ac anti-p65. En las células estimuladas con LPS observamos una gran unión de p65 a la importina $\alpha 3$, y en menor medida a las isoformas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ (Figura 28). Por el contrario, se detectó una unión muy disminuida en los extractos de CMLV pretratados con el péptido SLN (Figura 28). Estos datos sugieren que el péptido SLN bloquea la unión directa entre el NF- κ B activado y las importinas α , inhibiendo de esta forma la translocación nuclear del factor de transcripción.

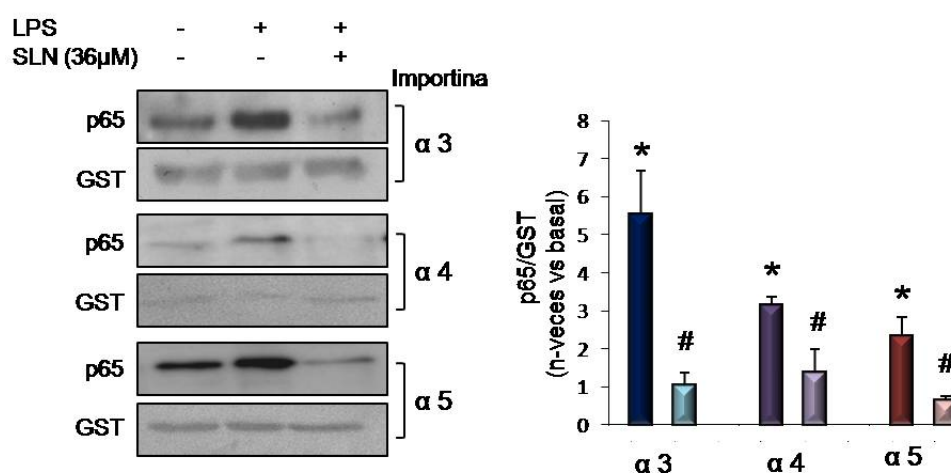


Figura 28: Inhibición de la interacción NF- κ B-importina por el péptido SLN. Ensayos de unión proteína-proteína *pull-down* en extractos nucleares de CMLV pretratados con péptidos SLN (36 μ M, 90 min) y estimulados con LPS (1 μ g/mL, 30 min). Las proteínas unidas a las importinas α inmovilizadas en lechos de sefarosa fueron separadas en geles de acrilamida y se identificaron con anticuerpos de p65 y GST (control de carga). Se muestran membranas representativas de 2-5 experimentos y el resumen del análisis densitométrico de las bandas (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS).

1.4. El péptido SLN inhibe la capacidad migratoria de células vasculares y macrófagos.

La migración celular es un proceso vital en la formación de la placa aterosclerótica. Las CMLV son capaces de migrar de la capa media del vaso hacia la capa íntima, donde proliferan y promueven el engrosamiento de la denominada capa neointima. En este trabajo, la capacidad migratoria de las CMLV en cultivo y el efecto del péptido SLN se estudiaron mediante dos técnicas diferentes. En primer lugar se realizaron ensayos de cierre de heridas o “wound-healing”. Para ello, se realizaron hendiduras de 1mm de grosor en una monocapa de CMLV y se midió la capacidad de colonización celular del espacio libre formado mediante la toma de imágenes de una zona determinada de la hendidura. Se observó que las células estimuladas con LPS tienen una mayor capacidad de migración en comparación con las mantenidas en condiciones basales, mostrando un mayor cierre de la brecha desde las 4 hasta las 24h de incubación a 37°C (Figura 29A). Además, se observó que el pretratamiento con el péptido SLN era capaz de inhibir

significativamente esta capacidad migratoria (Figura 29B). El segundo abordaje para el estudio de la capacidad migratoria fue el ensayo de transmigración en *transwell* con poros de 8µm, a través de los cuales las CMLV migran de forma dirigida desde el compartimento superior al inferior. Las células estimuladas con LPS durante 12h mostraron una mayor capacidad de migración que las células mantenidas en condiciones basales. Al igual que en los ensayos de heridas, la migración de CMLV inducida por LPS se redujo en presencia del péptido SLN (Figura 29C).

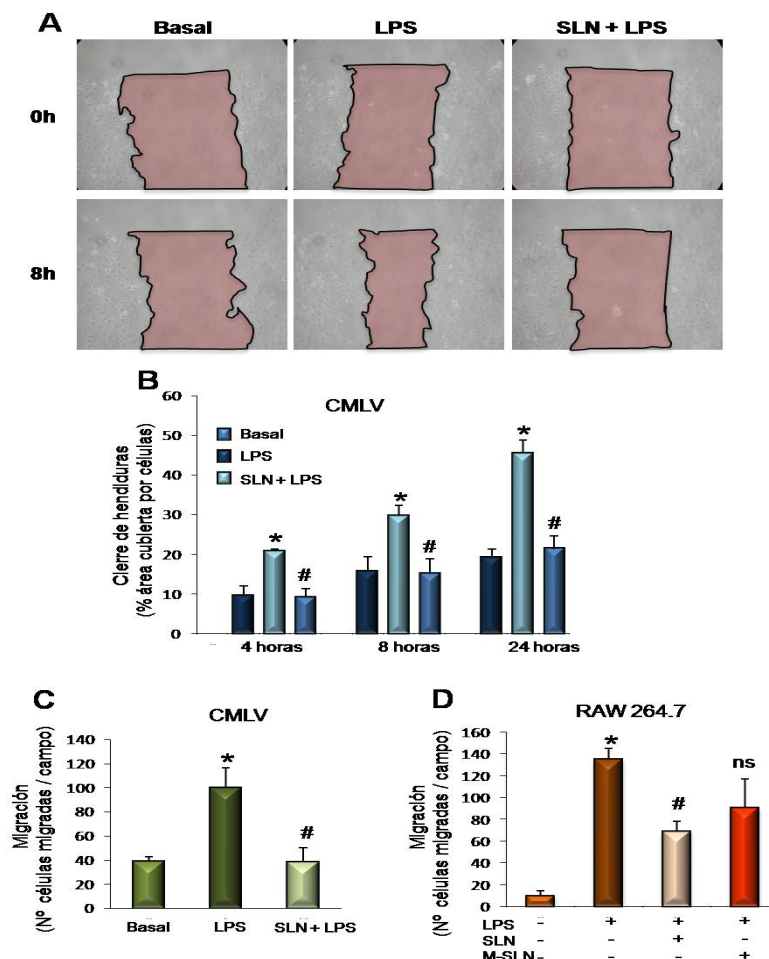


Figura 29: Efectos del péptido SLN en la migración celular.

(A) Fotografías de experimentos de *wound-healing* tomadas a tiempo inicial y a 8h en CMLV preincubadas con péptidos SLN y estimuladas con LPS. (B) Cuantificación de las imágenes tomadas y datos expresados como % de área recubierta por células tras la hendidura. (C) Migración de CMLV a través de *transwell* inducida por LPS a 12h en presencia o ausencia del péptido SLN. (D) Migración de macrófagos a través de *transwell* hacia la monocapa de CMLV sembrada en el pocillo inferior y pretratada con péptidos SLN y M-SLN y estimulada con LPS. (*, $P < 0.05$ vs basal; #, $P < 0.05$ vs LPS).

En estos estudios analizamos también la capacidad migratoria de los macrófagos, otro de los principales tipos celulares implicados en la formación de neoíntima. Para ello, realizamos ensayos de transmigración de macrófagos desde los *transwell* hacia el compartimento inferior, donde habíamos sembrado CMLV. Se estimuló con LPS la monocapa inferior de CMLV en presencia o ausencia del péptido SLN, se permitió migrar a los macrófagos (RAW 264.7) durante 8h y posteriormente se realizó el conteo de las células que atravesaron la membrana. El número de macrófagos migrados hacia los pocillos con CMLV estimuladas con LPS fue significativamente mayor que en los pocillos de células no estimuladas. Además, la preincubación con el péptido SLN previno la atracción de los macrófagos hacia las CMLV estimuladas con LPS.

Bajo las mismas condiciones experimentales, el péptido mutado no tuvo un efecto significativo (Figura 29D).

2. Estudios *in vivo*: Tratamiento con el péptido SLN en la aterosclerosis experimental.

Una vez comprobamos las acciones inhibitorias del péptido SLN sobre la activación del factor NF- κ B y sus genes y funciones dependientes, tanto en células vasculares como en macrófagos, quisimos analizar su posible efecto *in vivo* en un modelo de aterosclerosis en ratón. Para ello, utilizamos ratones apoE^{-/-} que desarrollan lesiones ateroscleróticas similares a las humanas de forma acelerada cuando son alimentados con dieta rica en grasa¹³⁰. Se utilizaron ratones macho de 2 meses de edad que fueron divididos en dos grupos: 1) Control (N=9, vehículo: 2.5% acetonitrilo en salino estéril); 2) Tratado con el péptido SLN (N=9, 0.13 μ mol/día). Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales cada dos días durante 4 semanas y se alimentaron con dieta hipercolesterolémica durante este tiempo.

2.1. El tratamiento con el péptido SLN reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica y su contenido inflamatorio.

En primer lugar analizamos la lesión aterosclerótica en el arco aórtico de los ratones de los grupos control y tratado. Las aortas se extrajeron, se embebieron en OCT y se realizaron cortes de 8 μ m de grosor (960 μ m totales a partir de las válvulas aórticas). Mediante tinción de Oil-red-O/hematoxilina (Figura 30A) se midió el tamaño de la lesión a lo largo del arco aórtico. Observamos que el grupo tratado con el péptido SLN (Figura 30B) presentaba un menor tamaño de lesión a lo largo de la aorta en comparación con el grupo control. Además, el cálculo de la lesión máxima media en ambos grupos mostró una reducción significativa del 46 \pm 11%, en el grupo tratado (Figura 30C).

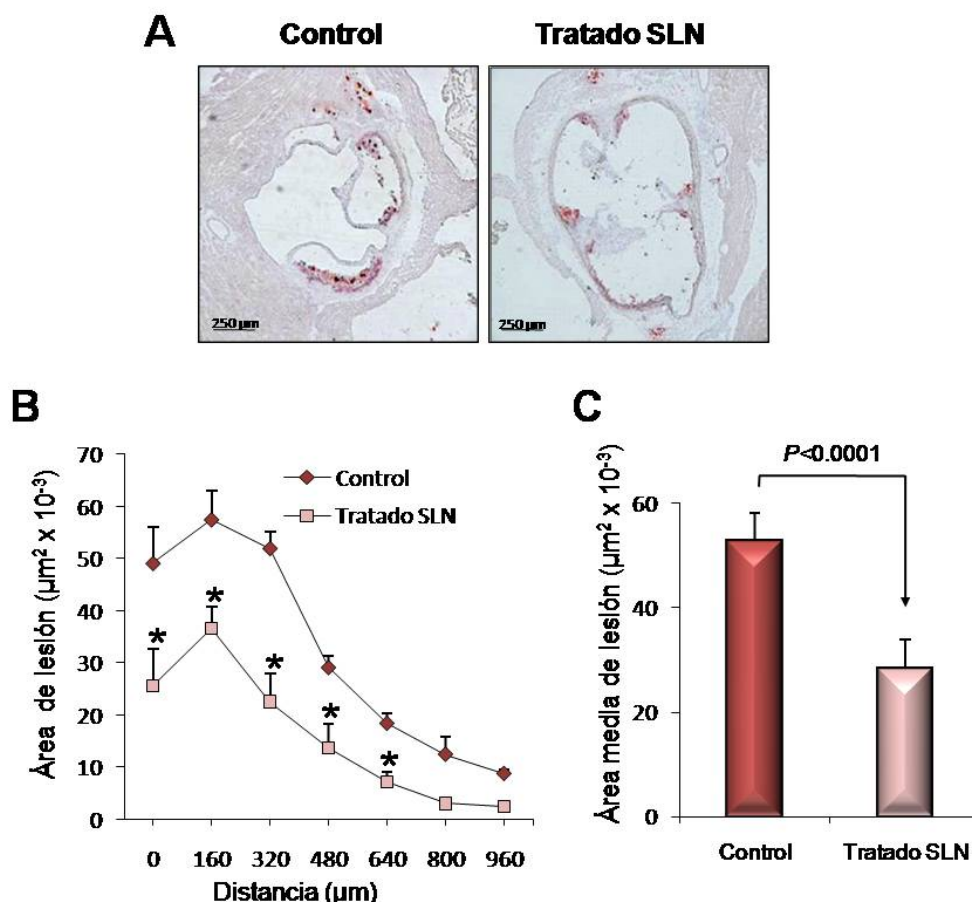


Figura 30: El tratamiento con péptidos SLN reduce la aterosclerosis. (A) Micrografías representativas (ampliación x40) de tinciones de Oil-red-O/hematoxilina en aortas de ratones apoE^{-/-} tratados con péptidos SLN o vehículo (grupo control) y mantenidos con dieta rica en grasa durante 4 semanas. (C) Promedio de las lesiones máximas de los ratones. Los valores son media \pm error estándar de N=9 animales por grupo (*, $P < 0.05$ vs grupo control). (B) Cuantificación del área de lesión a lo largo de la aorta en ratones tratados con péptidos SLN y controles.

Quisimos comprobar si estas diferencias en el tamaño de la lesión eran debidas a diferencias de peso corporal o de colesterol sérico entre los grupos de estudio. No encontramos variaciones significativas en el peso corporal de los ratones de ambos grupos tras el tratamiento de 4 semanas (Control: 23.8 ± 0.7 ; Tratado SLN: 23.8 ± 1 ; $P > 0.05$). Los valores de colesterol sérico medidos por ensayo colorimétrico tampoco variaron significativamente (296 ± 12 vs 265 ± 10 , $P > 0.05$) indicando que el tratamiento no había afectado a los niveles lipídicos.

Por su importancia en el desarrollo de las lesiones, estudiamos el efecto del péptido SLN en el contenido de macrófagos. Mediante tinción con el marcador de macrófagos MOMA-2 realizada en cortes de aorta próximos a la lesión máxima, pudimos observar que el grupo tratado con el péptido inhibidor presentaba un número menor de macrófagos infiltrados en comparación con el grupo control no tratado (% inhibición vs control: 48 ± 9 , Figura 31A y 31B). Además, el

análisis de regresión mostró que existía una correlación positiva entre el tamaño de la lesión y su contenido en macrófagos (Figura 31C).

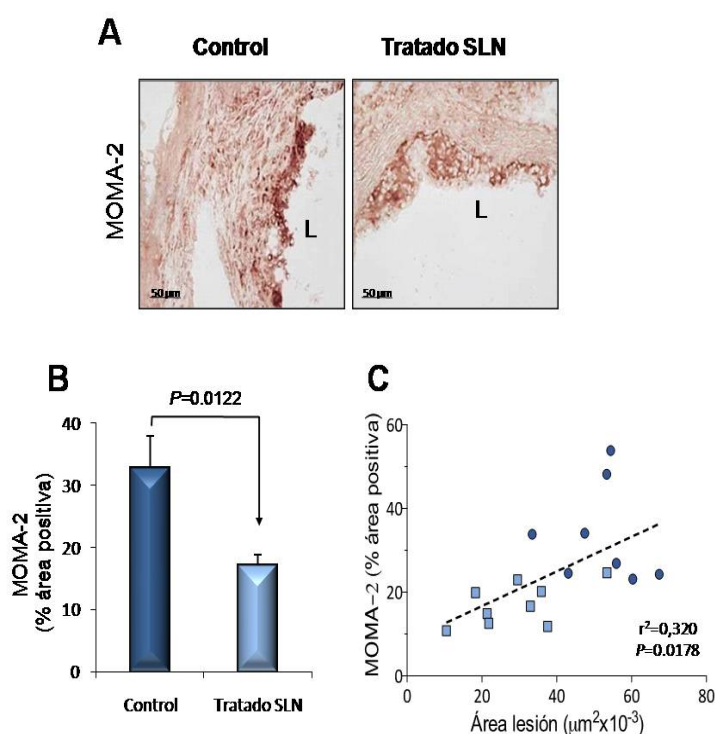


Figura 31: Reducción del número de macrófagos en las lesiones de ratones tratados con SLN. (A) Imágenes representativas de la acumulación de macrófagos en las lesiones de ratones tratados con péptidos SLN o con su vehículo. Ampliación x200 (L representa el lumen de la aorta). (B) Cuantificación de la tinción de MOMA-2, expresada como % de área de placa teñida con MOMA-2. Los datos se indican como media \pm error estándar de cada grupo. (C) Análisis de regresión de la tinción de MOMA-2 vs área de lesión en placas de ratones control (●) y tratados (○). La significación estadística y el coeficiente de correlación (r^2) se indican en cada gráfica.

2.2. El péptido SLN inhibe la actividad NF- κ B y la expresión de genes pro-inflamatorios en aortas de ratones ateroscleróticos.

Como ya hemos comentado, la entrada de monocitos/macrófagos al interior de la lesión es potenciada por numerosos mediadores pro-inflamatorios controlados por el factor de NF- κ B. Por lo tanto, y para confirmar los efectos *in vitro* del péptido SLN, analizamos la activación de NF- κ B *in situ* en las lesiones, así como la expresión de mediadores inflamatorios.

En primer lugar detectamos la activación *in vivo* de NF- κ B en las células vasculares y macrófagos infiltrantes de la lesión. Para ello, combinamos dos técnicas histológicas, Southwestern *in situ* e inmunohistoquímica, que permiten respectivamente la detección de NF- κ B activado y la colocalización con cada tipo celular (MOMA-2 para macrófagos y α -actina para CMLV). Un ejemplo de este análisis se muestra en la figura 32.

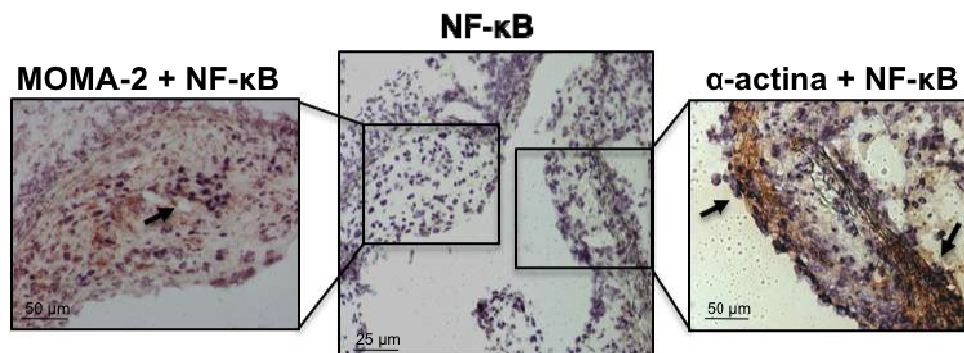


Figura 32: Colocalización de NF-κB activado en células vasculares y macrófagos presentes en la lesión aterosclerótica. La activación de NF-κB en cortes de aorta de ratón apoE^{-/-} se realizó mediante Southwestern, que da una coloración violeta en el núcleo de las células. A continuación se realizó tinción inmunohistoquímica con Ac para MOMA-2 o α-actina para identificar el tipo celular activado (macrófagos o CMLV, respectivamente). Las flechas indican células con doble tinción para NF-κB en violeta y macrófagos o CMLV en marrón. Ampliaciones x100 y x200.

A continuación estudiamos el efecto del tratamiento con el péptido SLN en la activación del factor NF-κB en ambos grupos de nuestro modelo experimental. Se midió el porcentaje de área teñida mediante Southwestern *in situ* en relación con el tamaño de lesión de cada corte de aorta. Pudimos observar que el tratamiento con los péptidos redujo a casi la mitad la tinción de NF-κB en las lesiones (% inhibición vs control: 55 ± 11 ; Figura 33A). Además, el análisis de regresión mostró que la menor activación de NF-κB observada en los ratones tratados con el péptido se correlacionaba con un menor tamaño de la lesión ($r^2=0.3174$, $P=0.0185$) y menor contenido de macrófagos ($r^2=0.4347$, $P=0.004$).

Puesto que CCL2 es uno de las principales quimioquinas de macrófagos en las zonas de lesión y su expresión génica está controlada por NF-κB, estudiamos los niveles de expresión de este mediador en cortes de aorta próximas a la lesión máxima. El efecto del tratamiento con el péptido SLN sobre la expresión de CCL2 resultó incluso mayor que sobre el propio NF-κB. Así, el grupo tratado presentó una tinción de CCL2 muy disminuida en comparación con el grupo control (% inhibición vs control: 71 ± 3 , $P<0.0001$; Figura 33B). Al igual que en las anteriores variables estudiadas, los niveles de CCL2 se correlacionaron significativamente con el tamaño de la lesión, el contenido de macrófagos y la actividad NF-κB (Índices de correlación respectivos; $r^2=0.6161$, $P=0.0002$; $r^2=0.3071$, $P=0.021$; $r^2=0.3523$, $P=0.012$).

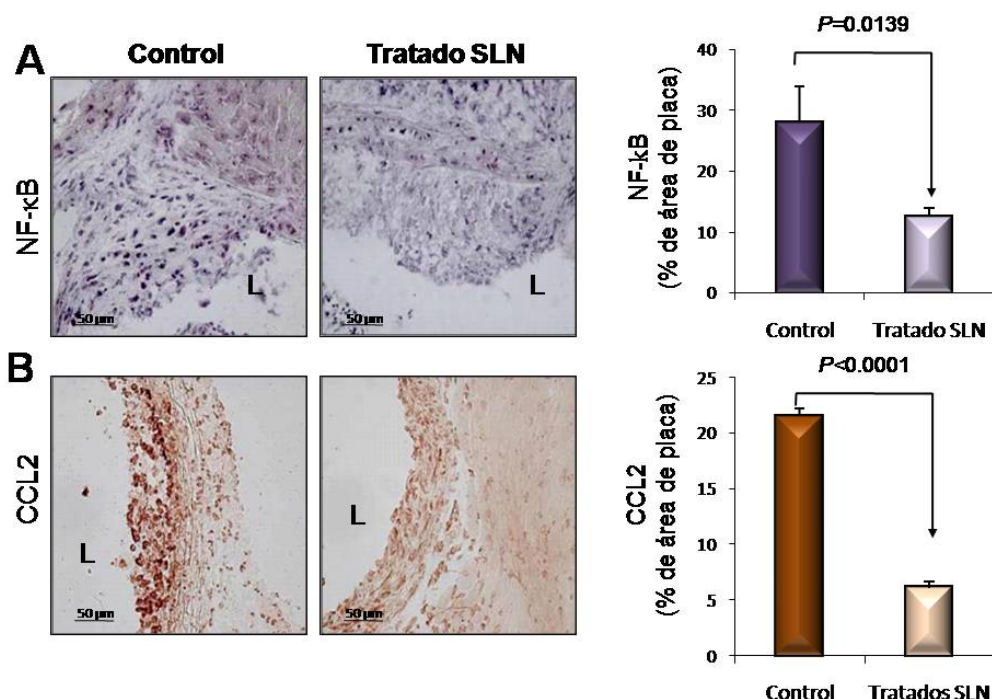


Figura 33: El tratamiento con el péptido SLN reduce la activación de NF-κB y la expresión de CCL2 en las lesiones ateroscleróticas. Microfotografías de secciones de aorta de ratones controles o tratados con el péptido SLN teñidas mediante Southwestern para NF-κB (A) inmunohistoquímica para CCL2 (B). Ampliación x200 (L representa el lumen de la aorta). La cuantificación de la tinción positiva en ambos casos se expresa como media \pm error estándar para cada grupo de estudio.

Finalmente, analizamos la expresión de varios genes pro-inflamatorios en el RNA extraído de tejido aórtico (región toraco-abdominal) de los ratones. Mediante PCR a tiempo real se confirmó una expresión reducida de ICAM-1, CCL2, CCL5, TNF- α e IL-6 en el grupo de ratones tratados con el péptido SLN (% inhibición vs control: 61 ± 7 , 58 ± 6 , 67 ± 7 , 55 ± 9 , 64 ± 9 , $P<0.05$; Figura 34).

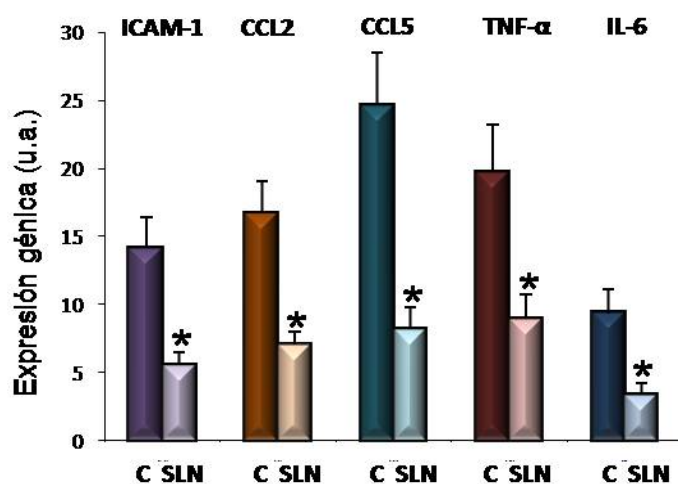


Figura 34: Expresión de genes inflamatorios en las aortas de ratones del modelo experimental. Análisis mediante PCR a tiempo real en tejido aórtico de ratones controles o tratados con el péptido SLN. Los valores se normalizaron por la expresión endógena de GAPDH y se expresan como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra la media \pm error estándar de cada grupo de estudio (*, $P<0.05$ vs control).



V. Discusión

El tratamiento de la aterosclerosis ha sido enfocado desde infinidad de puntos de vista diferentes a lo largo de las últimas décadas. La investigación en este campo está siendo tan ardua que no hay más que introducir la palabra “aterosclerosis” en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y ver que nos devuelve 86912 resultados a día de hoy. Por suerte, las diferentes investigaciones sobre el proceso de aterogénesis han ido aumentando nuestro conocimiento desde los días de Virchow y Rositansky hasta la actualidad, aunque todavía estamos lejos de evitar la formación de nuevas lesiones y más aún de reparar los daños ya establecidos. En esta tesis se ha enfocado el tratamiento de esta enfermedad desde dos puntos de vista diferentes (inmunidad e inflamación) aunque tan estrechamente relacionados que no pueden ser considerados de forma aislada. Aunque para cada uno de estos enfoques ya se han sugerido un buen número de posibles terapias y aproximaciones experimentales, en este trabajo proponemos dos nuevas alternativas con la esperanza de que algún día sirvan para reducir el terrible daño que esta enfermedad provoca en la población mundial.

PARTE I. ENFOQUE INMUNOLÓGICO: El papel de los FcγRs de leucocitos en el desarrollo de la aterosclerosis experimental.

La consideración de la aterosclerosis desde el punto de vista inmunológico es un concepto que está cobrando importancia en los últimos años. Estudios en humanos y modelos animales han demostrado la presencia de células y proteínas características de los procesos inmunes en todos los estadios del desarrollo de la lesión ateromatosa⁵⁵. Además, la deficiencia congénita de macrófagos y linfocitos T y B o la inhibición de algunos de sus mediadores tiene como resultado la reducción de la lesión aterosclerótica en ratones^{55, 81}. Todas estas evidencias nos llevan a pensar que los mecanismos inmunológicos participan en la aterogénesis y que su activación contribuye al desarrollo y progresión de esta enfermedad^{54, 55, 139}. Es también conocido que, en los procesos inflamatorios e inmunes, los FcγRs constituyen el nexo clave entre las células efectoras y los ligandos (anticuerpos o inmunocomplejos). Sin embargo, la regulación de estos receptores en la superficie de cada tipo celular y su implicación en las diferentes etapas de desarrollo de la aterosclerosis no se han estudiado con detalle.

Previamente nuestro grupo analizó el efecto de la deficiencia funcional de los FcγRs en la aterosclerosis mediante el estudio de ratones deficientes en el gen apolipoproteína E y en la cadena-γ, la subunidad activadora requerida para el ensamblaje y señalización de los receptores FcγR activadores (tipos I, III y IV)¹³⁶. Así, la deficiencia sistémica de los FcγR activadores resultó ser limitante en la formación de lesiones ateroscleróticas, ya que estos ratones mostraron lesiones más pequeñas y con menor infiltrado de leucocitos y expresión de mediadores inflamatorios⁶¹.

Durante la generación de las lesiones ateromatosas, el infiltrado de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia las lesiones es un proceso clave pues induce la activación del sistema inmune y produce un foco inflamatorio que, si no se resuelve apropiadamente en los primeros estadios, favorece el engrosamiento de la placa y aumenta su inestabilidad⁵⁴. Especialmente el reclutamiento de monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos es uno de los pasos claves en la patogenia de esta enfermedad. Estudios previos han demostrado que la inhibición de la maduración de los macrófagos frena su acumulación en las lesiones, lo que reduce su tamaño e inestabilidad¹⁴⁷.

En el trabajo mostrado en esta tesis nos planteamos analizar el papel de los FcγRs de los leucocitos en la formación de la placa aterosclerótica y especialmente los efectos sobre la funcionalidad y el fenotipo de los macrófagos infiltrantes. Nuestros estudios de trasplante de médula ósea demuestran que la deficiencia en la cadena-γ es suficiente para limitar la formación de las placas de ateroma en los ratones. Se comprobó que los mecanismos implicados en esta reducción eran independientes de cambios en los niveles séricos de lípidos o de diferencias en las respuestas Th1 (niveles de IgG₂) y Th2 (niveles de IgG₁). En lugar de esto, nuestros datos indican que la deficiencia en FcγRs dirige la distribución de la población de macrófagos dentro de la placa aterosclerótica hacia un fenotipo anti-inflamatorio.

Se considera que los procesos inflamatorios producen efectos adversos sobre el metabolismo de los lípidos y la biología de la pared arterial, lo que los convierte en uno de los mayores factores de riesgo para la aterosclerosis¹⁰⁵. Existen numerosas evidencias que indican que la inmunidad humoral (anticuerpos) y celular (macrófagos y linfocitos T) en respuesta a auto-Ag modificados por la hipercolesterolemia, como la oxidación de LDL, juega un papel primordial en el proceso aterogénico¹¹⁷. Varios estudios clínicos han demostrado que existe una asociación positiva entre el grado de inestabilidad de las placas ateroscleróticas y los niveles de anticuerpos contra LDLox, principalmente de los isotipos IgM e IgG^{95, 98}. En ratones hipercolesterolémicos también se ha observado una producción aumentada de IgM e IgG anti-LDLox^{148, 180}. Los niveles elevados de anticuerpos IgM se consideran ateroprotectores, ya que contribuyen al mantenimiento de un bajo nivel de LDLox en plasma y evitan que los macrófagos presentes en las lesiones capturen LDLox, reduciendo así la acumulación de colesterol y de células espumosas en las placas ateroscleróticas^{64, 144}. Por otro lado, los anticuerpos IgG tienen un efecto proaterogénico mediado por la formación de inmunocomplejos por unión a las LDLox y la posterior activación de señales inflamatorias dependientes de FcγR en los macrófagos^{65, 117}. De hecho, se ha demostrado que los FcγRs son los receptores más importantes en la eliminación de IC que contienen LDLox¹⁶³. En el presente estudio, a pesar de la diferencia en el tamaño de las lesiones entre el grupo reconstituido con médula ósea de ratones γ^{-/-}apoE^{-/-} en comparación con los controles, no observamos diferencias significativas en los niveles de IgM específicos de LDLox. Sin embargo, la titulación de IgG anti-LDLox mostró un aumento de estos anticuerpos en el grupo

trasplantado con células $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$. Aunque no está demostrado, podemos especular que este hecho es debido a la reducida capacidad fagocítica de los macrófagos deficientes en Fc γ R. Estudios previos en modelos murinos han relacionado la hipercolesterolemia severa con un cambio de subtipos de IgG típicos de respuesta Th1 (IgG_{2a}) a los característicos de respuesta Th2 (IgG₁)¹⁸⁰. Este cambio a Th2 coincidió con una reducción de la respuesta mediada por IFN- γ y un aumento de la respuesta mediada por la IL-4, citoquina mediadora de la maduración de macrófagos con fenotipo reparador. Por otro lado, también se ha demostrado que la depleción de linfocitos B reduce la producción de anticuerpos específicos de LDLox y disminuye las lesiones ateroscleróticas en ratones⁴. En nuestro modelo experimental, las concentraciones de ambas subclases (IgG_{2a} e IgG₁) se encontraron aumentadas en el suero de los ratones trasplantados con médulas $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$, lo que sugiere que, en lugar de una activación policlonal de linfocitos B, los dos tipos de linfocitos T (Th1 y Th2) están implicados en la respuesta contra las LDLox. Aunque nuestro patrón de Ig indica una mayor respuesta Th1 y Th2 en el grupo trasplantado $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$, el análisis de su proporción relativa (Th1/Th2) no mostró diferencias importantes en la composición de linfocitos T. Nuestro estudio se realizó en ratones con lesiones tempranas y las mediciones de anticuerpos se realizaron a tiempo final. Podríamos especular, de acuerdo con los trabajos anteriormente mencionados¹⁸⁰, que la respuesta Th1/Th2 podría cambiar a tiempos más largos y con lesiones más severas, donde probablemente la ausencia de Fc γ R activadores tendría efectos sobre ambas poblaciones linfocitarias.

La expresión coordinada de Fc γ Rs activadores e inhibidores asegura la homeostasis de las respuestas inflamatorias inducidas por los IC. Numerosos estudios muestran que la administración de Ig o de sus fragmentos Fc es una forma efectiva de modulación de la actividad de los Fc γ R en diversos modelos de enfermedades inflamatorias (entre ellas la aterosclerosis) y subrayan la vital importancia de la estrecha regulación de estos receptores^{120, 170}. Un elegante estudio demuestra que la administración intravenosa de Ig humanas enteras en ratones apoE $^{-/-}$ es capaz de reducir la formación de lesiones ateroscleróticas a través del fragmento constante Fc, pero no de la región variable de reconocimiento antigénico F(ab')₂¹⁷⁶. Además, la deficiencia genética de los Fc γ Rs activadores está asociada con una inflamación disminuida en respuesta a los IC, mientras que en los animales deficientes en el receptor inhibidor Fc γ RIIb se observa un agravamiento del proceso inflamatorio^{106, 157}. En ratones ateroscleróticos, tanto en deficientes en el receptor de LDL (LDLR $^{-/-}$)¹⁷⁸ como en deficientes en el gen apoE, la ausencia de Fc γ RIIb agravó las lesiones ateromatosas y aumentó la síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α (23). Por el contrario, en un trabajo realizado con ratones ateroscleróticos con doble deficiencia en LDLR y Fc γ RIII, la ausencia de este receptor activador redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en un 30%, a la vez que aumentó la producción de citoquinas Th2, como IL-4 e IL-10⁷³. Nuestro trabajo previo en ratones con deficiencia sistémica en la cadena- γ asociada a los Fc γ Rs activadores demostró que estos ratones desarrollaban menores placas

ateroscleróticas, caracterizadas por un bajo contenido leucocitario y menor expresión de mediadores inflamatorios⁶¹. Posteriormente, Ng et al.¹¹⁵ mostraron que la ateroprotección presentada por los ratones deficientes en FcγRs se debía a la mayor generación de linfocitos T-reguladores CD4⁺ y a la consiguiente menor presencia de linfocitos Th17 CD4⁺. Los datos presentados en esta tesis, complementan estos cambios inmunológicos descritos previamente y apuntan directamente al papel vital que los FcγRs de los macrófagos residentes e infiltrantes juegan en el desarrollo de las placas. Sin embargo, no podemos descartar que los FcγRs afecten la funcionalidad de otras células, ya que el trasplante de médula ósea puede reconstituir otras poblaciones de leucocitos diferentes a los monocitos/macrófagos aunque menos abundantes que éstos¹⁶⁸. Además, las células embrionarias hematopoyéticas son también capaces de diferenciarse a células progenitoras de células endoteliales y CMLV¹⁴³ y recientemente se ha descrito que las células de médula ósea acumuladas en las lesiones ateroscleróticas pueden diferenciarse a células espumosas, contribuyendo así al remodelado vascular y al engrosamiento de las placas¹⁷³. Las propias células endoteliales y CMLV en cultivo expresan diferentes tipos de FcγRs y su estimulación provoca la liberación de mediadores inflamatorios, lo que sugiere posibles efectos proaterogénicos *in vivo*^{61, 107, 124}. Por todo ello, se necesitan más estudios para demostrar fehacientemente la contribución relativa de las células residentes y infiltrantes en la generación de lesiones ateroscleróticas.

La presencia de anticuerpos anti-LDLox y de receptores FcγRs en las placas de ateroma humanos ha sido previamente descrita en pacientes ateroscleróticos, tanto en placas como en células circulantes^{52, 135}. En modelos murinos, estudios de transferencia de linfocitos T CD4⁺ específicos para LDLox han demostrado que las respuestas Th1 juegan un papel importante en el desarrollo de las lesiones, ya que los linfocitos T CD4⁺ activados específicamente con LDLox inducen mayores lesiones que los activados por otros Ag no relacionados con la aterosclerosis¹⁸¹. Nuestro trabajo demuestra que la reconstitución de médula ósea con células deficientes en la cadena-γ en ratones con aterosclerosis incipiente reduce su desarrollo sin modificar los niveles lipídicos en plasma. Además, el menor tamaño de las placas se correlacionó con un reducido número de linfocitos CD4⁺ y macrófagos MOMA-2⁺, indicativo de una atenuación del sistema inmune proaterogénico en las arterias de los ratones trasplantados. En paralelo con el infiltrado leucocitario, la deficiencia de FcγRs en las células hematopoyéticas disminuyó la expresión de moléculas de adhesión celular y de dos de las principales citoquinas proaterogénicas (CCL2 y TNF-α) implicadas en la activación y migración de leucocitos durante la formación de las lesiones^{47, 158}.

Estudios anteriores de nuestro grupo habían demostrado la activación del factor de transcripción NF-κB y de sus genes diana en la aterosclerosis experimental⁹⁶. NF-κB es uno de los principales reguladores de las respuestas inmunoinflamatorias que controla la expresión génica de

citoquinas y tiene un papel muy importante en la aterogénesis⁴⁷. También hemos demostrado previamente la activación de NF- κ B mediante estimulación de Fc γ Rs en diferentes tipos celulares en cultivo entre ellos CMLV y monocitos^{46, 61}. En línea con esto, los datos de esta tesis demuestran que la deficiencia en Fc γ Rs redujo la activación de NF- κ B en las células de las capas neointima y media de la pared del vaso, lo que indica que los efectos inflamatorios de este factor de transcripción pueden ser regulados por la acción de los ICs sobre las células infiltrantes de la placa aterosclerótica. Estos datos no excluyen la contribución de otros factores inflamatorios sistémicos cuya expresión está aumentada en la aterosclerosis, como diversas citoquinas séricas o la proteína C-reactiva^{131, 158}, pero sugieren que los efectos aterogénicos de los Fc γ Rs están mediados principalmente por células inmunoinflamatorias localizadas en las placas.

Además de la reducción del infiltrado de macrófagos, la deficiencia en Fc γ R tuvo consecuencias en el fenotipo de los mismos. En los ratones trasplantados con médulas $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$, se produjo un aumento en los marcadores de macrófagos M2 (activados de forma alternativa-reparadores de tejidos) y un considerable descenso en los marcadores M1 (pro-inflamatorios-activados de forma clásica). Aunque esta clasificación se puede considerar simplista en cierta manera, ha sido de gran utilidad a la hora de caracterizar la heterogeneidad fenotípica de los macrófagos presentes en las placas ateroscleróticas⁹⁹. Varios trabajos previos analizan la asociación entre el fenotipo de los macrófagos y la progresión de la aterosclerosis en ratones. Así, las lesiones tempranas están infiltradas de macrófagos del tipo M2 reparadores, mientras que los del tipo M1 pro-inflamatorios prevalecen durante la progresión de las placas⁷⁶. Las células M1 acumuladas en los vasos dañados son capaces de secretar numerosas citoquinas inflamatorias encargadas de amplificar la respuestas Th1, inducir la proliferación de CMLV y favorecer la oxidación de lipoproteínas por la producción de especies reactivas de oxígeno^{127, 154}. En nuestro trabajo, el menor contenido lipídico y la disminución del tamaño de las lesiones está relacionado con la reducción del número de macrófagos y de mediadores inflamatorios. Todos estos factores se asocian con una menor proporción relativa de los fenotipos M1/M2 de macrófagos, determinado por la expresión diferencial de las isoformas de arginasa. Estas arginasas presentes en los macrófagos convierten la arginina a ornitina y urea y compiten directamente con la enzima NOS por su substrato. Recientemente se ha demostrado que sus dos isoformas (Arg2 mitocondrial y Arg1 citosólica) se pueden utilizar como marcadores respectivos del fenotipo de macrófagos M1 y M2 durante la aterosclerosis^{76, 113}. De hecho, los macrófagos clásicos M1 de las lesiones expresan Arg2 e iNOS, pero no Arg1, mientras que los activados de forma alternativa M2 expresan la Arg1 exclusivamente. En el trabajo presentado en esta tesis, la prevalencia del marcador M2 (Arg1) en lesiones aórticas de ratones trasplantados con células de ratones deficientes en Fc γ Rs sugiere que estas lesiones más pequeñas contienen más macrófagos de fenotipo reparador y menos del fenotipo pro-inflamatorio, lo que podría estar relacionado con una menor vulnerabilidad de las placas. Estos resultados *in vivo* se corroboraron en estudios *ex vivo*

con macrófagos sistémicos extraídos de peritoneos murinos, donde la menor acumulación de células espumosas en los ratones deficientes para la cadena- γ se asoció con una significativa reducción en el marcador M1 y un aumento en el M2. Por otro lado, y en concordancia con lo anterior, nuestros resultados con macrófagos en cultivo derivados de células de médula ósea de ratones ateroscleróticos demuestran que la activación de los Fc γ Rs con IC (agregados solubles de IgG) polariza estos macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio M1, caracterizado además por una mayor expresión de genes inflamatorios y producción de anión superóxido. A diferencia de estas células, los macrófagos derivados de médulas deficientes en Fc γ R mostraron una reducción en el marcador M1 y genes inflamatorios y menor estrés oxidativo. Estos datos están en línea con un trabajo previo donde se muestra que la activación con IC, induce un fenotipo de macrófagos más parecido a M1 que a M2 en función de su producción de citoquinas y su funcionalidad³⁴. Por otro lado, la estimulación selectiva del receptor inhibidor Fc γ RIIb, pero no de los activadores (I y III) en monocitos humanos es capaz de inducir el fenotipo M2 y de la quimioquina Th2 CCL1¹⁴⁵. Otro estudio mecanístico demostró que los receptores Fc γ Rs activadores y la vía de NF- κ B están implicados en la polarización de monocitos humanos hacia el fenotipo M1 inducido por la proteína C-reactiva³³. En línea con estos datos, nuestro trabajo indica que el papel proaterogénico de los receptores activadores Fc γ Rs está relacionado con sus acciones inflamatorias y pro-oxidantes en los macrófagos.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que los receptores activadores Fc γ Rs participan en el control del balance de los fenotipos de macrófagos en la pared arterial de los ratones ateroscleróticos (Figura 35). Por lo tanto, proponemos que futuras estrategias para modular el balance entre los receptores Fc γ R activadores/inhibidores y sus funciones efectoras podrían suprimir la progresión de la aterosclerosis redirigiendo las poblaciones de macrófagos inflamatorios hacia un fenotipo reparativo M2.

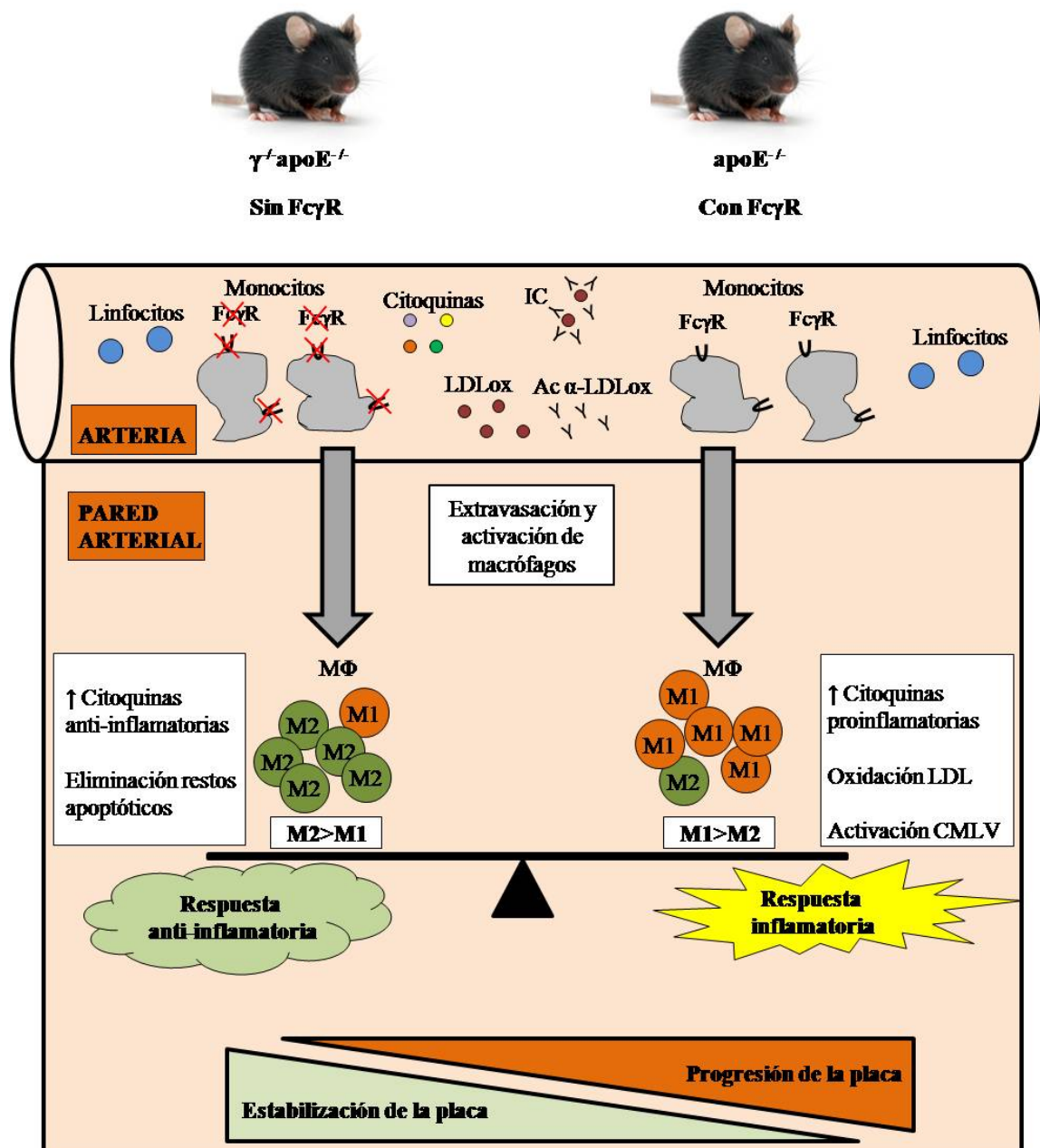


Figura 35: Esquema de la modulación de las poblaciones de macrófagos en las lesiones ateromatosas.

PARTE II. ENFOQUE INFLAMATORIO: El tratamiento con el péptido inhibidor de la translocación nuclear de NF- κ B reduce el proceso inflamatorio en las lesiones ateroscleróticas del modelo experimental.

NF- κ B es uno de los factores de transcripción inflamatorios más importantes en la aterosclerosis ya que controla la expresión génica de moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias en la pared del vaso²⁵. Se ha detectado NF- κ B activado en células sanguíneas, así como en macrófagos, células endoteliales y CMLV de las placas ateroscleróticas de pacientes^{10, 102, 167} y modelos animales^{41, 51, 96}. En esta tesis investigamos las propiedades anti-inflamatorias de un inhibidor altamente selectivo de NF- κ B, tanto en aterosclerosis experimental como en células vasculares de músculo liso y macrófagos murinos. Nuestro trabajo demuestra que la inhibición de NF- κ B mediante el uso de péptidos SLN que bloquean la translocación nuclear fue capaz de reducir el tamaño de la lesión aterosclerótica inhibiendo procesos vitales para su generación, como la infiltración de leucocitos, la activación y migración de CMLV y la producción de mediadores inflamatorios.

A lo largo de la última década, la modulación de la inflamación mediada por NF- κ B se ha convertido en un importante campo de investigación para múltiples grupos internacionales⁴². De hecho, hoy en día varios inhibidores de NF- κ B se encuentran en fase II/III de desarrollo clínico en varias enfermedades inflamatorias⁴⁷. Sin embargo, la mayoría de la investigación cardiovascular se encuentra todavía en fase preliminar de experimentación en laboratorio. Diferentes estudios en modelos murinos de aterosclerosis han demostrado la eficacia de diversos inhibidores del factor NF- κ B, entre los que destacan los fitoquímicos resveratrol¹²² y partenolide⁹⁶, el antioxidante ebselen¹⁹ e inhibidores sintéticos como DHMEQ²⁰ y bortezomib¹⁶¹. Todos estos compuestos afectan a los diferentes pasos de la cascada previa a la formación del dímero de NF- κ B, desde la activación de las quinasas de I κ B (IKKs), hasta la fosforilación de I κ B y su posterior degradación por el sistema de la ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, se ha prestado poco interés a la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B en enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis.

En este trabajo utilizamos un péptido sintético que contiene la secuencia de localización nuclear de la proteína de la familia Rel (p50) unida a la región-h de la secuencia señal del factor de crecimiento Kaposi de fibroblastos. Esta secuencia permite la permeabilidad del péptido a través de las membranas celulares, tanto de la plasmática como de la nuclear⁹⁰. Además, el péptido SLN ha sido ciclado mediante la inserción de dos cisteínas flanqueando la secuencia de localización nuclear, lo que produce un puente disulfuro entre ellas que mejora su permeabilidad celular¹⁷². Varios estudios preclínicos han demostrado la eficacia de diferentes secuencias de

péptidos permeables. Por ejemplo, en un modelo de fallo renal inducido por tóxicos¹⁵¹, la utilización de un péptido denominado TPV capaz de unirse a la toxina Shiga producida por *E. coli* disminuyó significativamente el daño renal, la albuminuria, los niveles de creatinina y aumentó la supervivencia de los ratones. Sin embargo, la administración de este péptido de forma intravenosa se descartó debido a la existencia de casos de diarreas hemorrágicas en algunos pacientes tratados con el TPV. El tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica también ha sido abordado mediante el uso del péptido permeable SS-31 con efectos antioxidantes¹²⁸, cuyo tratamiento aumentó la supervivencia de los ratones, mejoró su movilidad y redujo la pérdida de neuronas motoras. Otro péptido permeable demostró su validez en el tratamiento del cáncer de vejiga⁵⁶. En este caso, igual que en nuestro trabajo, para evitar la unión entre dos proteínas, se identificó la secuencia aminoacídica específica y se sintetizó junto con el fragmento de permeabilidad celular. El tratamiento previno la interacción entre proteínas, lo que activó las vías apoptóticas y redujo el tamaño de los tumores en los ratones. De forma análoga, el uso de péptidos permeables también disminuyó el daño tisular en modelos de inflamación aguda y crónica¹⁵³. En línea con estos estudios, nuestro trabajo presentado en la segunda parte de la tesis es la primera descripción de los efectos protectores de los péptidos inhibidores de NF- κ B en la aterosclerosis experimental.

Los agentes pro-inflamatorios como el LPS bacteriano son capaces de activar las respuestas inflamatorias de CMLV y macrófagos a través de los receptores “toll-like”^{85, 96, 149, 172}. La activación de esta vía induce la liberación del dímero clásico de NF- κ B (p65-p50) y la expresión génica de una enorme cantidad de mediadores pro-inflamatorios⁸⁰. Los resultados de nuestros experimentos llevados a cabo en CMLV de cultivo primario de ratón y en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7, confirmaron que la estimulación con LPS promueve la translocación nuclear de NF- κ B y la unión al DNA en sus secuencias específicas κ B. La preincubación de las células con el péptido SLN, pero no con el control estructural mutado, evitó esta activación inducida por LPS. Este hecho está en línea con las observaciones previas de otros grupos realizados en macrófagos murinos y células endoteliales, dos tipos celulares implicados en la formación de las lesiones ateroscleróticas. En estos experimentos, el tratamiento con diferentes péptidos inhibidores conteniendo la secuencia SLN disminuyó la translocación nuclear de NF- κ B y la activación de mediadores inflamatorios inducidos por la estimulación con LPS sin afectar a otras vías de señalización intracelular^{92, 165, 172}.

En este trabajo estudiamos también los efectos *in vivo* de los péptidos SLN en un modelo de aterosclerosis acelerada, los ratones deficientes en apolipoproteína E alimentados con dieta rica en grasa. En este modelo, el tratamiento con los péptidos SLN produjo una disminución significativa del tamaño de las lesiones aórticas de los ratones ateroscleróticos sin mostrar cambios en los niveles séricos de colesterol. El tratamiento también redujo el número de macrófagos infiltrantes, así como la expresión de CCL2, la principal quimioquina implicada en el

reclutamiento de monocitos/macrófagos. Este hecho sugiere una disminución del ambiente inflamatorio de la zona de lesión. Además, se observó que el tratamiento con péptido SLN inhibe la activación *in situ* de NF- κ B en las lesiones y que esta reducción se correlacionaba con la disminución del tamaño de las lesiones y el menor contenido de macrófagos y CCL2. Estos efectos anti-inflamatorios de los péptidos SLN concuerdan con las observaciones previas en diferentes modelos experimentales, como el modelo de daño corneal producido por un agente abrasivo, donde la administración tópica del péptido SLN inhibió la activación de NF- κ B, la invasión de macrófagos y la producción de citoquinas¹⁴¹. De igual forma, en un modelo murino de apoptosis hepática inducida por LPS, el tratamiento con péptidos de secuencia parecida redujo la expresión de citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6 y CCL2) y genes pro-apoptóticos (caspasas y Bax), aumentándo así la supervivencia de los ratones⁹¹.

La inflamación es una de las principales fuerzas conductoras de la aterosclerosis desde las lesiones tempranas hasta la formación de grandes placas vulnerables. Numerosos componentes inflamatorios celulares y moleculares participan en este proceso, incluyendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, la infiltración de leucocitos y la activación y migración de CMLV⁸⁸. La adhesión de leucocitos a las CMLV es uno de los puntos iniciales de la formación de lesiones aterogénicas y es un proceso mediado por diferentes moléculas de adhesión, como ICAM-1. Se ha demostrado en un modelo murino que la delección de esta molécula disminuye las placas ateroscleróticas²⁴. Por otro lado, el reclutamiento de leucocitos a las lesiones ateroscleróticas en formación también implica la expresión de proteínas quimiotácticas como CCL2 y CCL5¹¹. Se ha descrito previamente que diversos antagonistas de las acciones de CCL2 y CCL5 reducen la formación de placas ateromatosas en ratones mediante el bloqueo de la migración de monocitos a estas áreas^{12, 47}. Nuestro trabajo demuestra que el tratamiento con el péptido SLN inhibe la expresión génica de genes implicados en la infiltración de leucocitos (ICAM-1, CCL2 y CCL5) en CMLV y macrófagos estimulados con LPS. Además, en los ratones tratados con péptido SLN también se observó una disminución de estos mediadores inflamatorios, tanto en las lesiones ateroscleróticas como en otras zonas adyacentes de las aortas. Estos hallazgos son consistentes con la disminución del tamaño de las lesiones y de su contenido en macrófagos inducido por el tratamiento con péptido SLN en estos ratones. La terapia con péptido SLN también redujo la expresión génica de TNF- α e IL-6, dos citoquinas implicadas en la activación autocrina y paracrina de macrófagos y CMLV y en la amplificación de la respuesta inflamatoria durante la aterogénesis. Nuestros resultados son consistentes con un trabajo reciente en un modelo murino de diabetes tipo-1 en el que la inhibición del transporte nuclear de NF- κ B reduce las acumulaciones auto-reactivas de linfocitos y macrófagos dentro de los islotes pancreáticos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, a la vez que favorece la síntesis de citoquinas inmunomoduladoras¹⁰⁹.

Durante los estadios tempranos de la aterosclerosis, las CMLV migran hacia la capa íntima de las arterias en respuesta a diferentes mediadores y citoquinas secretados, produciendo así el engrosamiento de esta capa¹³⁹. En particular, varios estudios demuestran que algunas endotoxinas bacterianas y también las altas concentraciones de TNF- α son capaces de inducir la migración de CMLV en cultivo e incluso aumentar la formación de neoíntima *in vivo*^{84, 89}. Se ha demostrado que NF- κ B media la transmisión de las señales necesarias para la estimulación y migración de CMLV inducida por estímulos como la angiotensina II¹⁷⁷. De acuerdo con estos estudios, el trabajo presentado en esta tesis demuestra que el uso de dosis no tóxicas de péptido SLN inhibe la migración de CMLV inducida por LPS, cuantificada mediante dos técnicas diferentes (migración a través de poros y curación de heridas). El reclutamiento e infiltrado de macrófagos es otro proceso clave en los primeros estadios de la formación de lesiones ateromatosas. Las CMLV producen quimioquinas como CCL2 de forma dependiente de NF- κ B, lo que lleva a la atracción de los macrófagos²¹. Se ha demostrado previamente que el tratamiento con péptidos SLN inhibe la activación de macrófagos peritoneales y de líneas de macrófagos como las RAW 264.7^{83, 137}. En concordancia con estos antecedentes, nuestros estudios muestran que la inhibición de NF- κ B mediante los péptidos SLN, y no su control estructural mutado, reduce la migración de macrófagos hacia las CMLV estimuladas con LPS. Estos datos, junto con los efectos anti-inflamatorios en células vasculares y en el modelo murino de aterosclerosis, nos inducen a especular que la inhibición de la vía de NF- κ B mediante péptidos SLN podría ejercer una posible acción ateroprotectora en humanos.

En células eucariotas, los complejos de poro nuclear facilitan el transporte a través de la membrana nuclear de pequeñas moléculas (hasta 25KDa) de forma pasiva¹⁶⁴. Pero a partir de cierto tamaño, es necesaria la participación de proteínas transportadoras solubles denominadas importinas, que facilitan este transporte de forma específica de carga. En mamíferos sólo existe una importina β que se une directamente a las proteínas del poro nuclear y transporta la carga con la ayuda de las proteínas adaptadoras específicas, las importinas α . Hasta ahora se han descrito seis importinas α en mamíferos ($\alpha 1$, $\alpha 3$ - $\alpha 7$)¹⁷⁴ con diferentes afinidades por las proteínas transportadas e incluso específicas de estímulo y tipo celular^{36, 37}.

Se considera que los dímeros inactivos de NF- κ B se mantienen en el citoplasma celular debido a que sus represoras, las proteínas I κ B, enmascaran sus secuencias de localización nuclear. Tras la estimulación mediante diferentes receptores celulares, la secuencia de localización de NF- κ B se libera y se une a las importinas α para ser transportado al núcleo celular. La especificidad del dímero de NF- κ B por las importinas α puede variar en función del dímero que lo compone³⁶. Se ha descrito en varios trabajos que el dímero clásico de NF- κ B (p65-p50) es transportado específicamente por las importinas $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$, sin participación de las importinas $\alpha 1$ y $\alpha 7$ ^{35, 36}. En concordancia con estos datos, nuestros resultados muestran por primera vez que el dímero

clásico de NF- κ B activado en CMLV se une preferentemente a la importina $\alpha 3$ y en menor grado a las $\alpha 4$ y $\alpha 5$.

El péptido SLN diseñado para los estudios de esta tesis capaz de inhibir el transporte nuclear de NF- κ B inducido por la estimulación con LPS y mediado por las importinas α . Esta inhibición conlleva la reducción de la expresión génica de citoquinas inflamatorias dependientes de NF- κ B en CMLV y macrófagos. Existen varios trabajos que apoyan estas primeras evidencias nuestras. Por un lado, un trabajo reciente demuestra que los efectos inhibitorios de los péptidos SLN en la activación de NF- κ B y la posterior producción de TNF- α se deben al bloqueo de la unión importina $\alpha 3$ -NF- κ B en células de hepatoma humano y en macrófagos¹⁶⁹. En otro trabajo se describe la expresión reducida de importina $\alpha 3$ y el bloqueo de su interacción con NF- κ B como los mecanismos moleculares responsables de la acción inhibidora de la proteína prohibitina en las respuestas inflamatorias de células epiteliales intestinales estimuladas con TNF- α ¹⁵⁹.

Con todo, nuestros estudios demuestran que la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B en CMLV y macrófagos mediante el péptido permeable SLN reduce las respuestas inflamatorias en estas células y ejerce un efecto ateroprotector en un modelo de aterosclerosis murina (Figura 36), lo que podría ser potencialmente interesante como futuro tratamiento de la aterosclerosis humana.

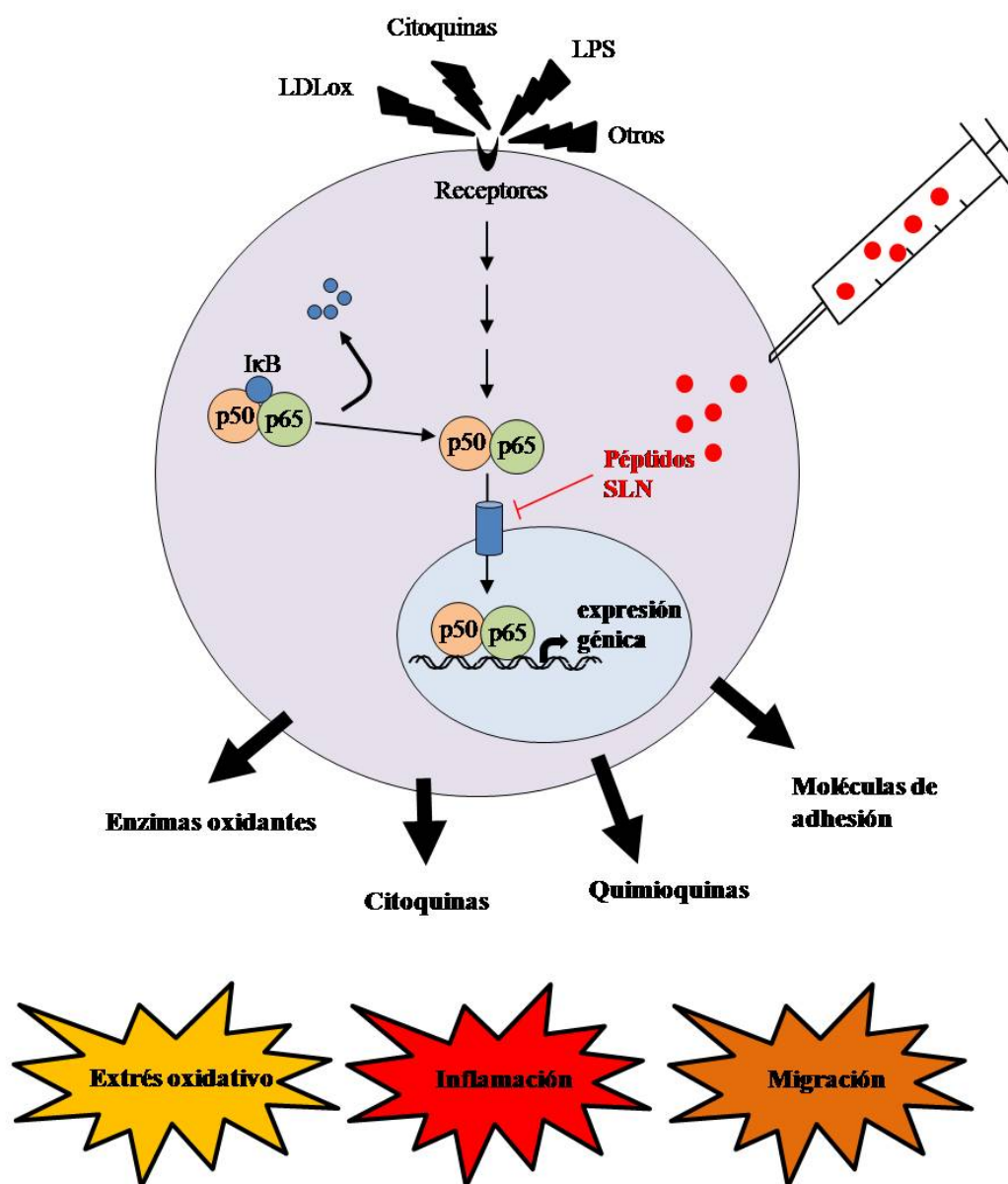


Figura 36: Mecanismo propuesto de la acción del péptido permeable SLN en la aterosclerosis experimental. La competición del péptido por la unión a las importinas bloquea la translocación nuclear del NF-κB activado, lo que inhibe la expresión de genes dependientes de la vía y limita los procesos inflamatorios asociados.



VI. Conclusiones

1. Los estudios realizados con ratones quimera generados por trasplante de médula ósea de donantes $\gamma^{-/-}$ apoE $^{-/-}$ a receptores apoE $^{-/-}$ demuestran que la deficiencia de los Fc γ R activadores en las células hematopoyéticas limita el desarrollo de la aterosclerosis. En estos ratones observamos una reducción en el tamaño de las lesiones aórticas, con menor infiltrado de macrófagos y linfocitos T CD4 $^{+}$ y una baja expresión de mediadores inflamatorios (ICAM-1, CCL2, CCL5, TNF- α y NF- κ B). La ausencia de Fc γ R no modificó la hipercolesterolemia de los ratones ni el patrón de inmunoglobulinas (totales y específicas de LDL oxidadas) características de las respuestas Th1 (niveles de IgG $_2$) y Th2 (niveles de IgG $_1$).

2. El análisis de marcadores fenotípicos de macrófagos en las lesiones y en las células peritoneales demostró que la deficiencia de Fc γ R activadores redujo la población de macrófagos pro-inflamatorios M1 y de células espumosas y aumentó los macrófagos con fenotipo reparador M2. Este cambio fenotípico puede explicar, al menos en parte, el efecto anti-aterogénico de la deficiencia de Fc γ R en estos ratones, abriendo un posible nuevo abordaje en el tratamiento de la aterosclerosis basado en el control de las poblaciones de macrófagos.

3. Los estudios en cultivos de macrófagos derivados de médula ósea demuestran que la deficiencia funcional en los Fc γ R activadores disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios (marcador M1, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión) así como el estrés oxidativo inducidos por la estimulación con IC.

4. El tratamiento de CMLV y macrófagos murinos con el péptido permeable SLN redujo de forma dosis-dependiente la translocación nuclear y posterior actividad transcripcional de NF- κ B inducidas por LPS. El péptido inhibidor SLN, pero no su control estructural mutante, redujo la capacidad migratoria en ambos tipos celulares y previno la expresión de genes dependientes de NF- κ B (ICAM-1, CCL2, CCL5, TNF- α e IL-6) sin comprometer la viabilidad celular. Finalmente, identificamos la importina α 3, y en menor medida α 4 y α 5, como las moléculas diana de la acción del péptido inhibidor.

5. El tratamiento in vivo con el péptido bloqueante de la translocación nuclear de NF- κ B redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en los ratones apoE $^{-/-}$ alimentados con dieta hiperlipídica, sin afectar los niveles de lípidos en suero. En las lesiones de los ratones tratados observamos una reducción en el contenido de macrófagos y una menor activación de NF- κ B en los macrófagos y células vasculares, junto con un descenso en la expresión de los genes pro-inflamatorios que controla este factor.

En conclusión, los estudios presentados en esta tesis ayudan a conocer mejor los mecanismos inmunes e inflamatorios implicados en el inicio y progresión de la aterosclerosis. Nuestros estudios proporcionan las bases para el desarrollo racional de nuevas terapias aplicables a la aterosclerosis, una enfermedad con un elevado impacto clínico y cuyo coste económico continúa en alza, a pesar de las mejoras en su tratamiento. Proponemos, por tanto, que la inmunomodulación basada en el bloqueo de los Fc γ R o la terapia anti-inflamatoria mediante inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B podrían ser interesantes abordajes en esta patología.



VII. Bibliografía

Bibliografia

- (1) Abraham Kierszenbaum. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 2007. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (2) Actis GC, Rosina F, Mackay IR. Inflammatory bowel disease: beyond the boundaries of the bowel. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011 June;5(3):401-10.
- (3) Adamson S, Leitinger N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr Opin Lipidol* 2011 October;22(5):335-42.
- (4) Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, Taleb S, Van VE, Esposito B, Vilar J, Sirvent J, Van SJ, Tedgui A, Tedder TF, Mallat Z. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2010 August 2;207(8):1579-87.
- (5) Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 May;31(5):969-79.
- (6) Aramburu J, Azzoni L, Rao A, Perussia B. Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med* 1995 September 1;182(3):801-10.
- (7) Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011 January 5;13(1):11-22.
- (8) Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998 August 27;394(6696):894-7.
- (9) Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007 August;6(2):137-43.
- (10) Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996 April 1;97(7):1715-22.
- (11) Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2007 May;97(5):714-21.
- (12) Braunersreuther V, Steffens S, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Proudfoot A, Mach F. A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 June;28(6):1090-6.

- (13) Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 February;27(2):373-9.
- (14) Burut DF, Karim Y, Ferns GA. The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology* 2010 October;61(7):679-89.
- (15) Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci* 2000 December;15:298-303.
- (16) Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999 January;45(1):7-17.
- (17) Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res* 2001 December 7;89(12):1155-60.
- (18) Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005 August;7(8):758-65.
- (19) Chew P, Yuen DY, Koh P, Stefanovic N, Febbraio MA, Kola I, Cooper ME, de Haan JB. Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 June;29(6):823-30.
- (20) Chiba T, Kondo Y, Shinozaki S, Kaneko E, Ishigami A, Maruyama N, Umezawa K, Shimokado K. A selective NFkappaB inhibitor, DHMEQ, reduced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *J Atheroscler Thromb* 2006 December;13(6):308-13.
- (21) Choi JH, Park JG, Jeon HJ, Kim MS, Lee MR, Lee MN, Sonn S, Kim JH, Lee MH, Choi MS, Park YB, Kwon OS, Jeong TS, Lee WS, Shim HB, Shin DH, Oh GT. 5-(4-Hydroxy-2,3,5-trimethylbenzylidene) thiazolidine-2,4-dione attenuates atherosclerosis possibly by reducing monocyte recruitment to the lesion. *Exp Mol Med* 2011 August 31;43(8):471-8.
- (22) Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 2008 May;263(5):479-88.
- (23) Chung AC, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011 May;22(5):802-9.
- (24) Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000 January 3;191(1):189-94.

-
- (25) Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001 February;107(3):255-64.
- (26) Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008 April 1;117(13):1649-57.
- (27) Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, Copin C, Scott-Algara D, Genze F, Buchele B, Syrovets T, Simmet T, Rouis M. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 February;28(2):272-7.
- (28) Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991 February 15;251(4995):788-91.
- (29) Daha MR. Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. *J Nephrol* 2000 November;13 Suppl 3:S89-S95.
- (30) Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 April 29;94(9):4642-6.
- (31) Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999 March;143(1):205-11.
- (32) Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Kohler M. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta* 2008 March;1783(3):394-404.
- (33) Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 June;31(6):1397-402.
- (34) Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006 December;80(6):1298-307.
- (35) Fagerlund R, Kinnunen L, Kohler M, Julkunen I, Melen K. NF-{kappa}B is transported into the nucleus by importin {alpha}3 and importin {alpha}4. *J Biol Chem* 2005 April 22;280(16):15942-51.
- (36) Fagerlund R, Melen K, Cao X, Julkunen I. NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules. *Cell Signal* 2008 August;20(8):1442-51.
- (37) Friedrich B, Quensel C, Sommer T, Hartmann E, Kohler M. Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol Cell Biol* 2006 December;26(23):8697-709.

- (38) Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005 September 20;46(6):937-54.
- (39) Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-97.
- (40) Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 November;27(11):2292-301.
- (41) Gareus R, Kotsaki E, Xanthouleas S, van der Meijde I, Gijbels MJ, Kardakaris R, Polykratis A, Kollias G, de Winther MP, Pasparakis M. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab* 2008 November;8(5):372-83.
- (42) Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 2006 October 30;25(51):6887-99.
- (43) Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol* 2012;3:1.
- (44) Gomez-Guerrero C, Duque N, Casado MT, Pastor C, Blanco J, Mampaso F, Vivanco F, Egido J. Administration of IgG Fc fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J Immunol* 2000 February 15;164(4):2092-101.
- (45) Gomez-Guerrero C, Duque N, Egido J. Stimulation of Fc(alpha) receptors induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma(1), phosphatidylinositol phosphate hydrolysis, and Ca²⁺ mobilization in rat and human mesangial cells. *J Immunol* 1996 June 1;156(11):4369-76.
- (46) Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, Hernandez-Vargas P, Blanco J, Egido J. Nitric oxide production in renal cells by immune complexes: Role of kinases and nuclear factor-kappaB. *Kidney Int* 2002 December;62(6):2022-34.
- (47) Gomez-Guerrero C, Mallavia B, Egido J. Targeting Inflammation in Cardiovascular Diseases. Still a Neglected field? *Cardiovasc Ther* 2011 April 1.
- (48) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010 May 28;32(5):593-604.
- (49) Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005 December;5(12):953-64.
- (50) Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 2001 February;59(2):415-24.
- (51) Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 August 1;97(16):9052-7.

- (52) Hakkinen T, Karkola K, Yla-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). *Virchows Arch* 2000 October;437(4):396-405.
- (53) Handel ML, Girgis L. Transcription factors. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001 December;15(5):657-75.
- (54) Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011 March;12(3):204-12.
- (55) Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002 August 23;91(4):281-91.
- (56) Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T. Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells. *Cancer Res* 2010 July 15;70(14):5829-39.
- (57) Haskard DO, Boyle JJ, Mason JC. The role of complement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2008 October;19(5):478-82.
- (58) Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 2011 February;21(2):223-44.
- (59) Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004 September 15;18(18):2195-224.
- (60) Hernandez-Presa MA, Gomez-Guerrero C, Egido J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int* 1999 January;55(1):209-14.
- (61) Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Lopez-Franco O, Suzuki Y, Gallego-Delgado J, Sanjuan G, Lazaro A, Lopez-Parra V, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fc gamma receptor deficiency confers protection against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circ Res* 2006 November 24;99(11):1188-96.
- (62) Ho AW, Wong CK, Lam CW. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates the expression of CCL2 and adhesion molecules of human proximal tubular epithelial cells through MAPK signaling pathways. *Immunobiology* 2008;213(7):533-44.
- (63) Hoffmann O, Zipp F, Weber JR. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in central nervous system inflammation. *J Mol Med (Berl)* 2009 August;87(8):753-63.
- (64) Horkko S, Bird DA, Miller E, Itabe H, Leitinger N, Subbanagounder G, Berliner JA, Friedman P, Dennis EA, Curtiss LK, Palinski W, Witztum JL. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin Invest* 1999 January;103(1):117-28.

- (65) Huang Y, Jaffa A, Koskinen S, Takei A, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL-containing immune complexes induce Fc gamma receptor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation in THP-1 macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 July;19(7):1600-7.
- (66) Huang Y, Yin H, Wang J, Liu Q, Wu C, Chen K. Aberrant expression of Fc gamma RIIIA (CD16) contributes to the development of atherosclerosis. *Gene* 2012 April 25;498(1):91-5.
- (67) Huber R. Spatial structure of immunoglobulin molecules. *Klin Wochenschr* 1980 November 17;58(22):1217-31.
- (68) Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992 April 15;148(8):2423-8.
- (69) Jovanovic V, Dai X, Lim YT, Kemeny DM, MacAry PA. Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 2009 December;12(4):293-8.
- (70) Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, Vergouwe MN, Partouns-Hendriks I, Fijneman RJ, Clausen BE, Forster I, Kockx MM, Rajewsky K, Kraal G, Hofker MH, de Winther MP. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2003 October;112(8):1176-85.
- (71) Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001 September 6;345(10):747-55.
- (72) Kelley JM, Edberg JC, Kimberly RP. Wegener's granulomatosis: a model of auto-antibodies in mucosal autoimmunity. *Clin Immunol* 2010 February;134(2):104-12.
- (73) Kelly JA, Griffin ME, Fava RA, Wood SG, Bessette KA, Miller ER, Huber SA, Binder CJ, Witztum JL, Morganelli PM. Inhibition of arterial lesion progression in CD16-deficient mice: evidence for altered immunity and the role of IL-10. *Cardiovasc Res* 2010 January 1;85(1):224-31.
- (74) Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 1990 October 15;271(2):285-96.
- (75) Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 2011 November;106(5):779-86.
- (76) Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010;5(1):e8852.
- (77) Kishimoto C, Yuan Z, Sano H, Shioji K, Xu Y, Yokode M. Antiatherosclerotic effects of the Fc portion of immunoglobulin in apolipoprotein E-deficient mice. *Exp Clin Cardiol* 2004;9(3):174-6.

- (78) Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther* 2010 September;127(3):295-314.
- (79) Kolenko V, Bloom T, Rayman P, Bukowski R, Hsi E, Finke J. Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. *J Immunol* 1999 July 15;163(2):590-8.
- (80) Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2003 December;9(12):549-57.
- (81) Laurat E, Poirier B, Tupin E, Caligiuri G, Hansson GK, Bariety J, Nicoletti A. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001 July 10;104(2):197-202.
- (82) Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998 November;38(11):981-93.
- (83) Lee KY, Lee MH, Chang IY, Yoon SP, Lim DY, Jeon YJ. Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*. *J Ethnopharmacol* 2006 February 20;103(3):372-8.
- (84) Lee SO, Jeong YJ, Yu MH, Lee JW, Hwangbo MH, Kim CH, Lee IS. Wogonin suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 expression by blocking the NF-kappaB activation via MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 December 8;351(1):118-25.
- (85) Leimgruber C, Quintar AA, Sosa LD, Garcia LN, Figueredo M, Maldonado CA. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *Prostate* 2011 July;71(10):1097-107.
- (86) Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Z, Jr., Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005 February 21;11(7):990-9.
- (87) Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 July;31(7):1506-16.
- (88) Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011 May 19;473(7347):317-25.
- (89) Lin FY, Chen YH, Tasi JS, Chen JW, Yang TL, Wang HJ, Li CY, Chen YL, Lin SJ. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 December;26(12):2630-7.
- (90) Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995 June 16;270(24):14255-8.

- (91) Liu D, Li C, Chen Y, Burnett C, Liu XY, Downs S, Collins RD, Hawiger J. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004 November 12;279(46):48434-42.
- (92) Liu D, Liu XY, Robinson D, Burnett C, Jackson C, Seele L, Veach RA, Downs S, Collins RD, Ballard DW, Hawiger J. Suppression of Staphylococcal Enterotoxin B-induced Toxicity by a Nuclear Import Inhibitor. *J Biol Chem* 2004 April 30;279(18):19239-46.
- (93) Liu YP, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ, Han M. Acetylbritannilactone suppresses lipopolysaccharide-induced vascular smooth muscle cell inflammatory response. *Eur J Pharmacol* 2007 December 22;577(1-3):28-34.
- (94) Lopes-Virella MF, Griffith RL, Shunk KA, Virella GT. Enhanced uptake and impaired intracellular metabolism of low density lipoprotein complexed with anti-low density lipoprotein antibodies. *Arterioscler Thromb* 1991 September;11(5):1356-67.
- (95) Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Lachin J, Nathan DM, Virella G. Levels of oxidized LDL and advanced glycation end products-modified LDL in circulating immune complexes are strongly associated with increased levels of carotid intima-media thickness and its progression in type 1 diabetes. *Diabetes* 2011 February;60(2):582-9.
- (96) Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 August;26(8):1864-70.
- (97) Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999 October;104(8):1041-50.
- (98) Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler Thromb* 1994 December;14(12):1892-9.
- (99) Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 October;29(10):1419-23.
- (100) Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002 November;23(11):549-55.
- (101) Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998 July 13;142(1):117-27.

- (102) Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, Tunon J, Egido J. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004 February;35(2):458-63.
- (103) Masuda M, Takahashi H. [Increase of soluble Fc gamma RIIIa derived from macrophages in plasma from patients with atherosclerosis]. *Rinsho Byori* 2002 May;50(5):502-5.
- (104) Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* 2006 July;449(1):96-103.
- (105) McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res* 2011 October;50(4):331-47.
- (106) Mendez-Fernandez YV, Stevenson BG, Diehl CJ, Braun NA, Wade NS, Covarrubias R, van LS, Witztum JL, Major AS. The inhibitory FcgammaRIIb modulates the inflammatory response and influences atherosclerosis in male apoE(-/-) mice. *Atherosclerosis* 2011 January;214(1):73-80.
- (107) Mineo C, Gormley AK, Yuhanna IS, Osborne-Lawrence S, Gibson LL, Hahner L, Shohet RV, Black S, Salmon JE, Samols D, Karp DR, Thomas GD, Shaul PW. FcgammaRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. *Circ Res* 2005 November 25;97(11):1124-31.
- (108) Mironova MA, Klein RL, Virella GT, Lopes-Virella MF. Anti-modified LDL antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000 June;49(6):1033-41.
- (109) Moore DJ, Zienkiewicz J, Kendall PL, Liu D, Liu X, Veach RA, Collins RD, Hawiger J. In vivo islet protection by a nuclear import inhibitor in a mouse model of type 1 diabetes. *PLoS One* 2010;5(10):e13235.
- (110) Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011 April 29;145(3):341-55.
- (111) Mor A, Shav-Tal Y. Dynamics and kinetics of nucleo-cytoplasmic mRNA export. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010 November;1(3):388-401.
- (112) Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003 February;73(2):209-12.
- (113) Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998 June 1;160(11):5347-54.
- (114) Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* 2007 September;21(11):2642-54.

- (115) Ng HP, Burris RL, Nagarajan S. Attenuated atherosclerotic lesions in apoE-Fcγ-chain-deficient hyperlipidemic mouse model is associated with inhibition of Th17 cells and promotion of regulatory T cells. *J Immunol* 2011 December 1;187(11):6082-93.
- (116) Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariety J, Hansson GK. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J Clin Invest* 1998 September 1;102(5):910-8.
- (117) Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control?. *J Intern Med* 2008 May;263(5):464-78.
- (118) Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005 July;23(1):41-51.
- (119) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 2007;96:179-204.
- (120) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006 January;24(1):19-28.
- (121) Nimmerjahn F, Ravetch JV. FcγRs in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;350:105-25.
- (122) Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 2007 April;191(2):265-71.
- (123) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617-48.
- (124) Ortiz-Munoz G, Martin-Ventura JL, Hernandez-Vargas P, Mallavia B, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Munoz-Garcia B, Fernandez-Vizcarra P, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 April;29(4):525-31.
- (125) Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 January 31;92(3):821-5.
- (126) Park SY, Ueda S, Ohno H, Hamano Y, Tanaka M, Shiratori T, Yamazaki T, Arase H, Arase N, Karasawa A, Sato S, Ledermann B, Kondo Y, Okumura K, Ra C, Saito T. Resistance of Fc receptor- deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1998 September 15;102(6):1229-38.
- (127) Pello OM, Silvestre C, De PM, Andres V. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 2011 November;216(11):1172-6.

- (128) Petri S, Kiaei M, Damiano M, Hiller A, Wille E, Manfredi G, Calingasan NY, Szeto HH, Beal MF. Cell-permeable peptide antioxidants as a novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2006 August;98(4):1141-8.
- (129) Pfeiffer JR, Howes PS, Waters MA, Hynes ML, Schnurr PP, Demidenko E, Bech FR, Morganelli PM. Levels of expression of Fcγ receptor IIA (CD32) are decreased on peripheral blood monocytes in patients with severe atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001 March;155(1):211-8.
- (130) Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4471-5.
- (131) Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2001 October 18;88(8A):10K-5K.
- (132) Radstake TR, Petit E, Pierlot C, van de Putte LB, Cornelis F, Barrera P. Role of Fcγ receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003 May;30(5):926-33.
- (133) Raghavan M, Bjorkman PJ. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:181-220.
- (134) Rahman A, Fazal F. Blocking NF-κB: an inflammatory issue. *Proc Am Thorac Soc* 2011 November;8(6):497-503.
- (135) Ratcliffe NR, Kennedy SM, Morganelli PM. Immunocytochemical detection of Fcγ receptors in human atherosclerotic lesions. *Immunol Lett* 2001 July 2;77(3):169-74.
- (136) Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275-90.
- (137) Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van HR, de CR, Tedgui A, Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res* 2007 April 27;100(8):1226-33.
- (138) Robinson JL, Carr IM, Cooper DL, Rashid LH, Martin SG, Emery P, Isaacs JD, Barton A, Wilson AG, Barrett JH, Morgan AW. Confirmation of association of FCGR3B but not FCGR3A copy number with susceptibility to autoantibody positive rheumatoid arthritis. *Hum Mutat* 2012 April;33(4):741-9.
- (139) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 January 14;340(2):115-26.
- (140) Sage AP, Tsiantoulas D, Baker L, Harrison J, Masters L, Murphy D, Loinard C, Binder CJ, Mallat Z. BAFF Receptor Deficiency Reduces the Development of Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 March 15.
- (141) Saika S, Miyamoto T, Yamanaka O, Kato T, Ohnishi Y, Flanders KC, Ikeda K, Nakajima Y, Kao WW, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A. Therapeutic effect of topical administration of SN50, an inhibitor of nuclear factor-κB, in treatment of corneal alkali burns in mice. *Am J Pathol* 2005 May;166(5):1393-403.

- (142) Sarmay G. Functional studies on Fc receptors. *Immunol Today* 1992 August;13(8):A6-A9.
- (143) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002 April;8(4):403-9.
- (144) Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective?. *Circulation* 2004 October 26;110(17):2552-8.
- (145) Sironi M, Martinez FO, D'Ambrosio D, Gattorno M, Polentarutti N, Locati M, Gregorio A, Iellem A, Cassatella MA, Van DJ, Sozzani S, Martini A, Sinigaglia F, Vecchi A, Mantovani A. Differential regulation of chemokine production by Fcgamma receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J Leukoc Biol* 2006 August;80(2):342-9.
- (146) Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Pritchard KA, Jr. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 April;16(4):585-90.
- (147) Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 August 29;92(18):8264-8.
- (148) Smook ML, van LM, Heeringa P, Damoiseaux JG, Theunissen R, Daemen MJ, Lutgens E, Tervaert JW. Anti-oxLDL antibody isotype levels, as potential markers for progressive atherosclerosis in APOE and APOECD40L mice. *Clin Exp Immunol* 2008 November;154(2):264-9.
- (149) Son YH, Jeong YT, Lee KA, Choi KH, Kim SM, Rhim BY, Kim K. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008 January;51(1):71-7.
- (150) Sorrentino R, Arditi M. Innate immunity, Toll-like receptors, and atherosclerosis: mouse models and methods. *Methods Mol Biol* 2009;517:381-99.
- (151) Stearns-Kurosawa DJ, Collins V, Freeman S, Debord D, Nishikawa K, Oh SY, Leibowitz CS, Kurosawa S. Rescue from lethal Shiga toxin 2-induced renal failure with a cell-permeable peptide. *Pediatr Nephrol* 2011 May 21.
- (152) Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992 July 1;176(1):287-92.
- (153) Strickland I, Ghosh S. Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006 November;65 Suppl 3:iii75-iii82.
- (154) Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 October;29(10):1424-32.

- (155) Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001 January;107(1):7-11.
- (156) Tak PP, Kalden JR. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 2011;13 Suppl 1:S5.
- (157) Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2005 January;25(1):1-18.
- (158) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006 April;86(2):515-81.
- (159) Theiss AL, Jenkins AK, Okoro NI, Klapproth JM, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression. *Mol Biol Cell* 2009 October;20(20):4412-23.
- (160) Tsitsikov EN, Fuleihan R, McIntosh K, Scholl PR, Geha RS. Cross-linking of Fc gamma receptors activates HIV-1 long terminal repeat-driven transcription in human monocytes. *Int Immunol* 1995 October;7(10):1665-70.
- (161) Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol* 2010 January;105(1):39-50.
- (162) Van Vre EA, Van B, I, Bosmans JM, Vrints CJ, Bult H. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques. *Mediators Inflamm* 2011;2011:941396.
- (163) Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis* 2008 October;200(2):239-46.
- (164) Walther TC, Alves A, Pickersgill H, Liodice I, Hetzer M, Galy V, Hulsmann BB, Kocher T, Wilm M, Allen T, Mattaj IW, Doye V. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* 2003 April 18;113(2):195-206.
- (165) Wang Y, Zhang MX, Meng X, Liu FQ, Yu GS, Zhang C, Sun T, Wang XP, Li L, Wang YY, Ding SF, Yang JM, Zhang Y. Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011 May;300(5):H1743-H1752.
- (166) Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008 October;8(10):802-15.
- (167) Wilson SH, Best PJ, Edwards WD, Holmes DR, Jr., Carlson PJ, Celermajer DS, Lerman A. Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002 January;160(1):147-53.

- (168) Xu Y, Arai H, Murayama T, Kita T, Yokode M. Hypercholesterolemia contributes to the development of atherosclerosis and vascular remodeling by recruiting bone marrow-derived cells in cuff-induced vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 November 23;363(3):782-7.
- (169) Xue H, Chen B, Fan Y, Palikhe M, Li Y. The inhibitory effect of polypeptide cSN50 on alcoholic hepatic injuries through blocking the binding of NF-kappaB to importin alpha. *Scand J Gastroenterol* 2011 July;46(7-8):931-40.
- (170) Yamamoto M, Kobayashi K, Ishikawa Y, Nakata K, Funada Y, Kotani Y, Masuda A, Takai T, Azuma T, Yoshida M, Nishimura Y. The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit immunoglobulin G on airway inflammation are dependent upon Fcgamma receptor IIb on CD11c(+) dendritic cells in a murine model. *Clin Exp Immunol* 2010 November;162(2):315-24.
- (171) Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004 February;29(2):72-9.
- (172) Yan L, X, Robinson D, Veach RA, Liu D, Timmons S, Collins RD, Hawiger J. Peptide-directed suppression of a pro-inflammatory cytokine response. *J Biol Chem* 2000 June 2;275(22):16774-8.
- (173) Yan P, Xia C, Duan C, Li S, Mei Z. Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells. *Int J Biol Sci* 2011;7(7):937-46.
- (174) Yasuhara N, Oka M, Yoneda Y. The role of the nuclear transport system in cell differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 2009 July;20(5):590-9.
- (175) Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 June 15;88(12):5252-6.
- (176) Yuan Z, Kishimoto C, Sano H, Shioji K, Xu Y, Yokode M. Immunoglobulin treatment suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via the Fc portion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 August;285(2):H899-H906.
- (177) Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer G, Thomas S. NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2002 December;34(12):1609-21.
- (178) Zhao M, Wigren M, Duner P, Kolbus D, Olofsson KE, Bjorkbacka H, Nilsson J, Fredrikson GN. FcgammaRIIB inhibits the development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Immunol* 2010 March 1;184(5):2253-60.
- (179) Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000 December 12;102(24):2919-22.

- (180) Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 1998 April 15;101(8):1717-25.
- (181) Zhou X, Robertson AK, Hjerpe C, Hansson GK. Adoptive transfer of CD4+ T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 April;26(4):864-70.
- (182) Ziegelbauer K, Gantner F, Lukacs NW, Berlin A, Fuchikami K, Niki T, Sakai K, Inbe H, Takeshita K, Ishimori M, Komura H, Murata T, Lowinger T, Bacon KB. A selective novel low-molecular-weight inhibitor of IkappaB kinase-beta (IKK-beta) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. *Br J Pharmacol* 2005 May;145(2):178-92.